

**Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen**

Klinik für Orthopädie

**Partikelinduzierte Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen**

Eine tierexperimentelle Studie

**I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n**  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Christina Brenner, geb. Zimmermann  
aus Aachen

2014

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer  
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. C. Wedemeyer  
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. H. P. Jennissen  
3. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Jahnen-Dechent, Aachen

Tag der mündlichen Prüfung: 5. November 2015



## Publikationen / Vorträge / Poster

1. Kauther, M.D., **Zimmermann, C.** (2011): Erhöhte partikelinduzierte Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen. Fortbildung für Orthopädie und Unfallchirurgie, Essen, 19.04.2011.
2. Kauther, M.D., **Zimmermann, C.** (2011): Erhöhte partikelinduzierte Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen. Winterseminar der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen.
3. Kauther, M.D., **Zimmermann, C.**, Jäger, M., Jahnen-Dechent, W., Wedemeyer, C. (2012): Verstärkte partikelinduzierte Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen. NRW Chirurgen Jahrestagung, Düsseldorf, 30.11.2012.
4. Kauther, M.D., **Zimmermann, C.**, Jäger, M., Jahnen-Dechent, W., Wedemeyer, C. (2013): Verstärkte partikelinduzierte Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen. III. Münchener Symposium für experimentelle Orthopädie, Unfallchirurgie und muskuloskelettale Forschung, 21.-22.02.2013.
5. Kauther, M.D., **Zimmermann, C.**, Hußmann, B., Lendemann, S., Jahnen-Dechent, W., Jäger, M., Wedemeyer, C. (2013): Der Fetuin-A Knock-out prädisponiert zur partikelinduzierten Osteolyse. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, 24.10.2013.
6. Kauther, M.D., **Zimmermann, C.**, Bachman, H., Hilken, G., Bröcker-Preuß, M., Tötsch, M., von Knoch, M., Jahnen-Dechent, W., Löer, F., Wedemeyer, C. (2009): Partikelinduzierte Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen. 8. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen.
7. Kauther, M.D., **Zimmermann, C.**, Jahnen-Dechent, W., Jäger, M., Wedemeyer, C. (2013): Verstärkte partikelinduzierte Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen. Osteologie 2013, Weimar, 6.3.-9.3.2013.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Publikationen .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Coxarthrose .....	7
1.2 Geschichte der Hüftendoprothetik .....	7
1.3 Hüftendoprothetik .....	8
1.4 Klinische Bedeutung der Hüftprothesenlockerung .....	9
1.5 Partikelinduzierte Osteolyse .....	10
1.6 Gleitpaarungen bei Hüftprothesen .....	12
1.7 Fetuin-A .....	13
1.8 Fragestellung der Arbeit .....	15
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 Tiermodell zur partikelinduzierten Osteolyse .....	17
2.1.1 Versuchsprinzip .....	17
2.1.2 Versuchstierhaltung .....	18
2.1.3 Tieranzahl .....	18
2.1.4 Polyethylenpartikel und ihre Aufbereitung .....	19
2.2 Partikelimplantation .....	20
2.2.1 Narkose und Operation .....	20
2.2.2 Visiten .....	21
2.2.3 Probengewinnung – Urin und Serologie .....	21
2.2.4 Probenaufbereitung – Urin und Serologie .....	22
2.2.5 Euthanasierung .....	22
2.3 Präparation des Mauskopfes .....	22
2.4 Präparation der Calvaria .....	23
2.5 Mikro-Computertomographie .....	23
2.5.1 Verfahren der Mikro-Computertomographie .....	23
2.5.2 Rekonstruktion der Mikro-CT-Bilder .....	24
2.5.3 Analyseverfahren .....	25
2.6 Histologische Aufbereitung .....	26
2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	26
2.6.2 TRAP-Färbung .....	26
2.7 Auswertungsverfahren der histologischen Präparate .....	26
2.7.1 Qualitative Beschreibung .....	27

2.7.2	Quantitative Beschreibung .....	27
2.8	Statistik .....	28
2.8.1	Normalverteilung .....	28
2.8.2	ANOVA .....	28
2.8.3	T-Test .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	Versuchstiere .....	30
3.1.1	Tägliche Visiten .....	30
3.1.2	Präparation .....	30
3.2	Biochemische Untersuchung .....	30
3.2.1	Vergleich der präoperativen Werte .....	30
3.2.2	Vergleich der prä- und postoperativen Werte .....	32
3.3	Analyse der Mikro-CT-Daten .....	35
3.3.1	Analyse von BV/TV und BV .....	35
3.3.2	3D-Analyse .....	37
3.4	Qualitative histologische Analyse der Knochenschnitte .....	39
3.4.1	Gruppe I - Wildtypmäuse ohne Partikelimplantation .....	40
3.4.2	Gruppe II - Wildtypmäuse mit Partikelimplantation .....	41
3.4.3	Gruppe III - Fetuin-A Knock-out-Mäuse ohne Partikelimplantation .....	42
3.4.4	Gruppe IV - Fetuin-A Knock-out-Mäuse mit Partikelimplantation .....	43
3.5	Quantitative histologische Analyse der Mittelliniensutur .....	44
3.6	Osteoklastenanzahl in der TRAP-Färbung .....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
4.1	Versuchsmodell .....	50
4.2	Phänotypen der Wildtypmäuse und Fetuin-A Knockout-Mäuse .....	51
4.3	Mikro-Computertomographie und Histomorphometrie .....	54
4.4	Verstärkte partikelinduzierte Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen .....	56
4.5	Ausblick .....	61
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>72</b>
7.1	Mikro-CT Bilder .....	72
7.2	Limulus Amoebocyten Assay .....	74
7.3	Herstellung der histologischen Schnitte .....	75
7.3.1	Entkalkung .....	75

7.3.2	Entwässerung.....	75
7.3.3	Ausguss in Paraffin .....	76
7.3.4	Schneiden der Präparate und Aufbringen auf den Objektträger .....	76
7.4	Färbung der Präparate .....	76
7.4.1	HE-Färbung .....	76
7.4.2	TRAP-Färbung .....	77
7.5	Tabellen .....	78
7.6	Abkürzungsverzeichnis .....	82
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>85</b>

## **1 Einleitung**

Unsere Gesellschaft wird immer älter, und damit steigt die Zahl der Menschen, die an degenerativen Erkrankungen leiden. Dazu zählt vor allem auch die Arthrose, eine Verschleißerscheinung der Gelenke. Sie ist eine der Hauptursachen für die Implantation einer Hüftendoprothese. In Deutschland gehört diese Operation mittlerweile zu den am häufigsten durchgeführten - mit steigender Tendenz. Noch vor wenigen Jahren wurden rund 170.000 primäre Hüftprothesen pro Jahr implantiert (Dreinhofer et al. 2006). Im Jahr 2010 waren es bereits rund 210.000 (Hillienhof 2011, Statistisches Bundesamt Deutschland 2012). Betroffen sind vor allem 65- bis 85-Jährige. In dieser Altersgruppe ist die Implantation einer Hüftendoprothese nach einer Datenerhebung des Statistischen Bundesamtes von 2008 die häufigste Operation überhaupt. Mit steigender Zahl implantierter künstlicher Hüftgelenke steigt auch die Zahl der Revisionseingriffe. Sie erhöhte sich in den Jahren von 2003 bis 2010 um 43 Prozent (Barmer 2010).

### **1.1 Coxarthrose**

Arthrose gehört weltweit zu den häufigsten Gelenkerkrankungen von Erwachsenen und nimmt mit steigendem Alter zu (Michael 2010). Bei der Hüfte spricht man von einer Coxarthrose, einer degenerativen Erkrankung des Gelenks. Mit dem Alter verliert der Gelenkknorpel fortschreitend an Höhe und Elastizität. Durch den Knorpelverlust kommt es zu einer Schädigung anderer Gelenkstrukturen, wie Knochen, Gelenkkapsel und Muskulatur. Das Gelenk wird zunehmend unbeweglicher und hält der Belastung nicht mehr Stand. Die Folgen sind zunächst Schmerzen bei Bewegung, später auch in Ruhephasen, sowie Bewegungseinschränkungen. Arthrose ist aber nicht nur eine Alterserscheinung, sondern kann auch durch übermäßige Belastung, Fehlstellungen oder durch traumatische Ereignisse hervorgerufen werden. Ist die Erkrankung weit fortgeschritten kann zur Schmerzreduktion und Wiederherstellung des Bewegungsumfangs ein künstliches Gelenk implantiert werden.

### **1.2 Geschichte der Hüftendoprothetik**

Die Implantation künstlicher Hüftgelenke hat eine lange Geschichte. Schon vor mehr als einhundert Jahren entwickelte der Chirurg Themistocles Gluck Elfenbeinprothesen, unter anderem für das Knie- und Hüftgelenk (Eynon-Lewis et al. 1992). Er experimen-

tierte mit verschiedenen Materialien, darunter neben Elfenbein auch mit Aluminium, Holz, Glas und vernickeltem Stahl.

1890 ersetzte Gluck in Berlin erstmals ein Kniegelenk durch eine Elfenbeinprothese. Das Gelenk der Patientin war durch Tuberkulose zerstört (Eynon-Lewis et al. 1992). Bis 1891 implantierte er insgesamt 5 künstliche Gelenke: drei Knie-, ein Ellenbogen- und ein Handgelenk. Allerdings gab es erhebliche Komplikationen, insbesondere durch Infektionen (Claes et al. 2012).

Die Ideen von Gluck wurden in den nachfolgenden Jahren von zahlreichen Medizinern aufgegriffen. So gab es beispielsweise Versuche mit Hüftkopfprothesen aus Gold und Elfenbein. 1922 implantierte Ernest William Hey-Groves einen Hüftkopf aus Elfenbein (Claes et al. 2012). Die erste Totalendoprothese einer Hüfte aus Metall wurde 1938 von Philipp Wiles in London eingesetzt (Claes et al. 2012).

Der Erfolg dieser frühen Implantationen war jedoch aufgrund von Materialversagen, Entzündung und Prothesenlockerung nur von kurzer Dauer. Den Durchbruch erzielte Ende der 50er Jahre Sir John Charnley. Er benutzte einen Zement, mit dem die Prothesen besser als bisher verankert werden konnten. Außerdem kombinierte er einen Metall- Hüftkopf mit einer Hüftpfanne aus Kunststoff, wodurch die Reibungskräfte deutlich verringert wurden. Als Pionier der Hüftendoprothetik in Deutschland gilt der Chirurg Hans-Wilhelm Buchholz. Ende der 60er Jahre mischte er dem Zement Antibiotika bei und konnte so die Infektionsgefahr deutlich reduzieren (von Foerster et al. 1987).

### **1.3 Hüftendoprothetik**

Die Implantation eines künstlichen Hüftgelenks gehört heute zu den Routineoperationen. Trotz der langjährigen Erfahrungen mit implantierten künstlichen Gelenken und deren Weiterentwicklung, etwa durch verbesserte Operationsverfahren und Werkstoffe (Maloney et al. 1999), gibt es nach wie vor Komplikationen. Laut dem Schwedischen Endoprothesenregister 2009 kommt es nach zwei Jahren bei 1,8 Prozent der implantierten Hüftendoprothesen zu einer Revisionsoperation, nach zehn Jahren steigt die Zahl auf 5 Prozent (Garellick et al. 2010). In den Jahren von 1979 bis 2009 waren die Hauptursachen dafür: aseptische Lockerung mit 73 Prozent, Dislokation mit 8,5 Prozent, Infektionen mit 7,6 Prozent und Frakturen mit 6,5 Prozent (Garellick et al. 2010). Klassischerweise wird bei einer Prothesenlockerung zwischen septischen und aseptischen Ursachen unterschieden. Letztere treten – wie oben dargelegt – bei weitem am häufigsten auf. Zu diesen aseptischen Ursachen zählen unter anderem mechanische Belastungen, die zu einer Vergrößerung des Periimplantatspalts führen, sowie die par-

tikelinduzierte Osteolyse. Sie wird als „abriebinduzierter Typ“ bezeichnet und macht nach einem allgemein anerkannten Klassifizierungssystem bei den aseptischen Ursachen mit 55 Prozent den größten Anteil aus (Baumann and Rader 2007).

#### **1.4 Klinische Bedeutung der Hüftprothesenlockerung**

Das Problem der Hüftprothesenlockerung gewinnt immer mehr an Bedeutung, denn mit der wachsenden Zahl der Erstimplantationen von künstlichen Hüftgelenken steigt auch die Zahl der Revisionsoperationen (Garellick et al. 2010). Eine von 10 Prothesenimplantationen ist eine Wechseloperation (Hillienhof 2011). Man geht davon aus, dass dieser Trend noch weiter zunimmt: Zum einen wegen der steigenden Lebenserwartung der Menschen, zum anderen, weil auch immer mehr junge Patienten ein neues Hüftgelenk benötigen (Cramer 2001).

Eine gelockerte Endoprothese ist für die betroffenen Patienten mit starken Schmerzen verbunden. Die einzige Therapie ist die invasive Wechseloperation, eine alternative Therapie gibt es bislang noch nicht. Hierbei kommt es jedoch zu einer Reduktion des Knochenstocks und zu einer erneuten Traumatisierung der hüftumspannenden Weichteile. Problematisch ist insbesondere die Schädigung des acetabulären Knochenlagers (Düll 2009). Die ausgetauschten Prothesen zeigen in der Regel weniger gute Ergebnisse und Standzeiten als die primär implantierten Prothesen (Callaghan et al. 1985, Hanssen and Rand 1988, Nouri 2008).

Wegen der steigenden Lebenserwartung sind mehrfache Wechseloperationen bereits heute eine operationstechnische Herausforderung. Genaue Zahlen darüber, welche Hüftgelenkimplantate in Deutschland mit welchen Langzeitresultaten eingesetzt wurden, liegen aktuell noch nicht vor. Seit April 2011 wird in Deutschland wie bereits in Schweden, Finnland, Norwegen sowie England und Wales ein Endoprothesenregister etabliert, in dem alle relevanten Daten erfasst werden. Dazu gehören: Indikation, Erstimplantation, Revisionseingriff, Fixierungsmethoden, Operationstechniken und verwendete Medizinprodukte. Das vorrangige Ziel ist es, die Qualität der endoprothetischen Versorgung vergleichend zu bewerten und zu verbessern. Für 2014 werden erste Ergebnisse erwartet (Endoprothesenregister 2013).

## 1.5 Partikelinduzierte Osteolyse

Bei der partikelinduzierten Osteolyse handelt es sich um eine abriebbedingte, multifaktorielle Veränderung des Knochenstoffwechsels rund um das Implantat, die letztlich zur Lockerung der Prothese führt.

Osteolyse bedeutet die Auflösung von Knochengewebe, der Knochenabbau übersteigt hierbei die Knochenneubildung, die Knochenstoffwechselbilanz ist also negativ.

Bei der partikelinduzierten Osteolyse spielen Abriebpartikel eine entscheidende Rolle. Sie entstehen, wenn Flächen aneinander reiben, etwa der Prothesenkopf an der Prothesenpfanne oder das Implantat am Zement. Die Partikel sind dem Prothesenmaterial entsprechend aus Polyethylen, Keramik oder Metall. Der von den Abriebpartikeln ausgelöste Prozess ist hoch komplex und beinhaltet eine Vielzahl von Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen.

In fast allen wissenschaftlichen Untersuchungen wird den Osteoklasten eine Schlüsselrolle bei der partikelinduzierten Osteolyse zugeschrieben. Sie sind demnach am stärksten für die lokale Knochenresorption verantwortlich (Baumann and Rader 2007). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Abriebpartikel nicht nur die Genese von Osteoklasten induzieren, sondern diese auch aktivieren und deren Apoptose inhibieren können (Baumann and Rader 2007).

Wichtig beim Prozess der partikelinduzierten Osteolyse sind des weiteren Makrophagen. Sie nehmen Abriebpartikel auf, können diese jedoch nicht verdauen. So stimuliert, sezernieren sie verschiedene Mediatoren und proinflammatorische Zytokine (Drees and Huber 2004). Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten dagegen spielen keine entscheidende Rolle bei der aseptischen Lockerung (Otto 2008). Bei den proinflammatorischen Zytokinen handelt es sich unter anderem um Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1 (IL 1), Interleukin 6 (IL 6) und Prostaglandin E2 (PGE2) (Otto 2008). Sie alle sind Knochenresorption fördernde Faktoren: So wirken TNF- $\alpha$  und IL 1 direkt auf Osteoklastenvorläuferzellen ein, indem sie diese in Osteoklasten umwandeln, oder sie fördern - wie die anderen Zytokine - die Bildung von Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) in Osteoblasten, auch bekannt als Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (TRANCE). Dieser Ligand, RANKL, ist das Schlüsselzytokin für die Osteoklastogenese und die Aktivierung von Osteoklasten.

RANKL gehört zum OPG/RANKL/RANK-Zytokinsystem. Es reguliert durch Osteoblasten und Osteoklasten den Knochenauf- und Knochenabbau und ist verantwortlich für die Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen. Das System ist notwendig für die



Differenzierung von Makrophagen und Monozyten als Osteoklasten-Vorläuferzellen in ausgereifte Osteoklasten (Silva and Sandell 2002). Makrophagen und Osteoklasten besitzen bis zur terminalen Differenzierung den gleichen Differenzierungsweg. Die terminale Differenzierung zu Osteoklasten wird durch zwei Osteoblasten-Proteine, Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) und RANKL, stimuliert. Das heißt: Ohne Osteoblasten bilden sich keine Osteoklasten (Löffler 2007). Der Receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) wiederum ist ein transmembranes Protein, das sich an der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen und Osteoklasten befindet (Purdue et al. 2006, Silva and Sandell 2002). Wenn RANKL an RANK bindet, wird eine intrazelluläre Signalkaskade unter anderem über den Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in Gang gesetzt. Sie führt zur Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten und verhindert deren Apoptose (Silva and Sandell 2002). Dadurch wird die Knochenresorption gefördert. Damit diese nicht überwiegt, wird von Osteoblasten das Protein Osteoprotegerin (OPG) sezerniert (Siebenand 2009). OPG ist der natürliche Gegenspieler von RANKL. Es bindet kompetitiv an RANKL, so dass sich RANKL nicht mehr an RANK binden kann (Silva and Sandell 2002). So wird die Signalkaskade unterbunden, und die Differenzierung zu Osteoklasten, deren Aktivierung und die Inhibition der Apoptose bleiben aus. Somit wirkt OPG der RANK/RANKL-Verbindung entgegen und inhibiert die Osteolyse (Huo and Brown 2003, Schmidt-Gayk 2004).

Da, wie oben dargelegt, die RANKL-Bildung bei der partikelinduzierten Osteolyse gesteigert wird, kommt es zur erhöhten Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten. Das natürliche Gleichgewicht ist gestört. Darüber hinaus bewirken Abriebpartikel eine Hochregulation der RANK-Expression in Makrophagen (Baumann et al. 2004).

Je kleiner die Abriebpartikel sind, desto eher werden sie phagozytiert und desto höher ist auch die biologische Aktivität (Drees and Huber 2004). Zahlreiche Studien belegen den direkten Zusammenhang zwischen Abriebpartikeln und Prothesenlockerung: Je größer die Menge der Abriebpartikel ist, desto ausgeprägter sind die Osteolysen (Drees and Huber 2004, Silva and Sandell 2002). Kleine Partikel mit einer Größe unter 1  $\mu$ m bewirken eine stärkere osteolytische Reaktion als größere (Green et al. 2000). Am häufigsten nachgewiesen wurden Partikel aus Polyethylen (Otto 2008). Bei einer Polyethylen-Metall-Gleitpaarung können bis zu 500.000 Partikel pro Schritt freigesetzt werden (Krenn 2013).

Maßgeblich für die Entstehung von Osteolysen sind nach heutigem wissenschaftlichem Verständnis zelluläre und enzymatische Vorgänge in der periprotetischen Membran.

Diese Gewebeschicht zwischen Knochen und Prothese ist bei suffizienten Implantaten im Schaftbereich zwischen 0,1 und 0,3 mm und im Pfannenbereich mit zunehmender Prothesenstandzeit bis zu 1 mm dick (Krenn 2013). Histopathologisch betrachtet, besteht die periprothetische Membran überwiegend aus Makrophagen, prothesenlockerungsspezifischen Fibroblasten und multinukleären Riesenzellen (Krenn 2013, Otto 2008). Größere Polyethylenpartikel mit mehr als 5 µm wurden vor allem in den Riesenzellen, kleinere mit weniger als 2 µm in den Makrophagen nachgewiesen (Krenn 2013).

Es gibt noch weitere Effekte der Abriebpartikel, die ebenfalls zu einer negativen Knochenbilanz führen. Abriebpartikel können beispielsweise auch auf Fibroblasten wirken, indem sie, wie bei den Osteoblasten, eine RANKL-Expression induzieren (Purdue et al. 2006). Das heißt, auch diese steuern zur Differenzierung, Aktivierung und Hemmung der Apoptose von Osteoklasten bei.

## 1.6 Gleitpaarungen bei Hüftprothesen

Nachdem T. Gluck und andere Mediziner Endoprothesen aus verschiedenen Materialien, wie zum Beispiel Elfenbein, erforscht haben, entwickelte schließlich Sir John Charnley 1959 das Urmodell aller modernen Hüftendoprothesen (Charnley 1961). Er kombinierte einen kleinen Metallkopf zunächst mit einer Pfanne aus Teflon, die er später durch Polyethylen ersetzte, um die Reibung zu reduzieren. Polyethylen (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) gehört zur Gruppe der Polyolefine. Charnley hatte schon früh die günstigen Eigenschaften von Polyethylen für die Verwendung bei Prothesen erkannt: geringer Abrieb, gute Gleitfähigkeit und eine geringe Wasseraufnahme. Polyethylen als Werkstoff für Prothesen ist bis heute im Einsatz und wurde ständig verbessert. Die wichtigste Weiterentwicklung ist quervernetztes Polyethylen, das deutlich niedrigere Abriebraten aufweist als herkömmliches Polyethylen. Allerdings gibt es hierzu noch keine Langzeitstudien (Martell 2007).

In der heutigen Orthopädie finden verschiedene Gleitpaarungen neben der Kombination Metall-Polyethylen Verwendung: Keramik-Polyethylen, Metall-Metall, Keramik-Keramik. In klinischen Studien werden auch Hart-Hart-Kombinationen aus Metall-Keramik erprobt.

Die am häufigsten verwendete Gleitpaarung ist Metall-Polyethylen (Patil et al. 2008). Jüngeren Patienten allerdings werden bevorzugt Hart-Hart-Gleitpaarungen, insbesondere aus Keramik, eingesetzt. Diese sind initial teurer, könnten jedoch theoretisch bis zu 40 Jahre halten, vorausgesetzt die Implantation wurde richtig durchgeführt (Cobb

2009). Wichtig hierbei ist die präzise Positionierung der Keramikgelenkpfanne. Der Winkel zwischen Hüftkopf und Hüftpfanne muss exakt stimmen, da es keinen „weichen Partner“ gibt, der sich dem harten Material anpassen kann wie bei einer Hart-Weich-Paarung (Cobb 2009). Nachteile der Keramik-Keramik-Paarung sind nicht nur die hohen chirurgischen Anforderungen, sondern auch die Kosten. Sie liegen deutlich über denen anderer Gleitpaarungen. Bei der Kombination Metall-Metall kommt es zu einer vergleichsweise hohen Menge an Abriebpartikeln und zur Freisetzung von nephrotoxischen Metall-Ionen (Ebramzadeh et al. 2011). Deswegen wird diese Gleitpaarung weniger eingesetzt. In Zellkulturversuchen stimulieren Metall-Partikel aus Titan eine höhere TNF- $\alpha$ -Ausschüttung als Keramikpartikel und könnten in vivo eine höhere Osteolyse bewirken (Bylski et al. 2009).

Trotz der Fortschritte bei Materialien, Produktdesign und Operationsmethoden ist das zentrale Problem der Lockerung durch Partikelabrieb nicht gelöst. Alle Gleitpaarungen produzieren in unterschiedlichem Ausmaß Abriebpartikel. Je größer der Durchmesser des Hüftkopfes, desto größer ist die Menge der Abriebpartikel. Andererseits steigen mit der Größe des Hüftkopfes die Stabilität und der Bewegungsumfang des Gelenks. Durch viel Aktivität des Patienten erhöht sich die Abriebmenge (Hendrich 2007, Martell 2007).

## 1.7 Fetuin-A

Das Glycoprotein Fetuin-A ist eines der wichtigsten systemischen Inhibitoren der ekto-phen Calcifikation (Jahnen-Dechent et al. 2011, Schäfer et al. 2003). Durch seine Interaktion mit dem ansonsten im menschlichen Körper schlecht löslichen Calciumphosphat hemmt Fetuin-A die Calciumphosphat-Präzipitation und verlangsamt das Wachstum von Kristallkeimen (Schäfer et al. 2003).

Fetuin-A wird bei Säugetieren überwiegend in der Leber exprimiert und ins Blut sezerniert (Dickson et al. 1975, Schäfer et al. 2003, Triffitt et al. 1976). Nach neueren Erkenntnissen wird es auch von Osteoblasten gebildet (Coen et al. 2009). Seine höchste Serumkonzentration erreicht es während der Fötalperiode (Ketteler et al. 2003, Schäfer et al. 2003), daher auch die Bezeichnung Fetuin. Das Protein, nach dem Namen seiner Entdecker auch als  $\alpha$ 2-Heremans-Schmid Glycoprotein (Ahsg) bekannt, ist auf dem Chromosom 3q27 lokalisiert (Szwera et al. 2002).

Struktur und Funktionsweise von Fetuin-A wurden in verschiedenen Studien untersucht. Fetuin-A besteht aus den drei Domänen D1 bis D3. Die ersten beiden Domänen sind Cystatin-ähnlich, daher zählt Fetuin-A zur Cystatin-Superfamilie der Proteine. Es

trägt Bindungsstellen für Calciumapatit und Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). Fetuin-A Knock-out-Mäuse, im Folgenden auch Ahsg-/- Mäuse genannt, mit genetischem Dilute brown non-agouti (DBA)/2 Hintergrund wiesen eine massive Calcifizierung verschiedener Organe auf (Schäfer et al. 2003). Unlösliche Calciumphosphate werden an einer  $\beta$ -Faltblattstruktur mit den sauren Aminosäuren von D1 gebunden. So kommt es zur Bildung von Calciprotein-Partikeln. Diese bestehen aus Fetuin-A, Calcium und Phosphat, haben einen Durchmesser von 30-150 nm, sind löslich und amorph, werden aber - abhängig von Zeit und Temperatur – nach und nach wieder unlöslich (Schäfer et al. 2003). Fetuin-A sorgt damit dafür, dass diese Kolloide über mehrere Stunden hinweg kolloidal in Lösung bleiben (Jahnen-Dechent et al. 2011, Ketteler et al. 2003, Schäfer et al. 2003). In dieser Zeit können die potentiell schädlichen Verbindungen aus dem Blutkreislauf entfernt oder im Knochen abgelagert werden (Jahnen-Dechent et al. 2011, Ketteler et al. 2003, Schäfer et al. 2003). Diese Ablagerungen werden bevorzugt von Phagozyten aufgenommen (Ketteler et al. 2003, Schäfer et al. 2003). Hrabowski et al. zeigten, dass sich Fetuin-A im Vergleich zu anderen Serumproteinen besonders stark in der mineralisierten Knochenmatrix anreichert (Hrabowski et al. 2004).

Fetuin-A ist damit ein wichtiges Protein zur Regulierung der (Nicht-) Calcifizierung. Sein Mangel hat schwerwiegende Folgen, wie Studien vor allem im Zusammenhang mit Dialysepatienten gezeigt haben. Viele dieser Patienten leiden schon frühzeitig an einer massiven Koronararterienverkalkung (Goodman et al. 1998). Es wurde festgestellt, dass sie im Vergleich zu gesunden Menschen signifikant niedrigere Fetuin-A Konzentrationen im Blut aufweisen, was mit einer erhöhten kardiovaskulären- und Gesamt-Sterblichkeit korreliert (Ketteler et al. 2003).

Andere Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Einfluss von Fetuin-A auf den Knochenumbau. Dazu gibt es allerdings keine übereinstimmenden Ergebnisse. Auf der einen Seite haben in-vitro Studien gezeigt, dass Fetuin-A als Promotor für Knochenremodeling und Zellvermehrung wirkt (Schäfer et al. 2003). Auf der anderen Seite zeigen Untersuchungen, dass Fetuin-A als Inhibitor des Knochenremodelings wirkt, indem es als Antagonist von TGF- $\beta$  und Bone morphogenetic protein (BMP) auftritt (Binkert et al. 1999).

Ein möglicher Einfluss von Fetuin-A auf die aseptische Prothesenlockerung wurde bislang nicht untersucht, jedoch gibt es Studien, die auf einen Zusammenhang hindeuten.

So beschleunigt Fetuin-A die Phagozytose von Fremdpartikeln und die Apoptose von Zellen (Jersmann et al. 2003). Dies könnte bei Ahsg<sup>-/-</sup> Mäusen mit partikelinduzierter Osteolyse die Phagozytose von Polyethylenpartikeln reduzieren und zu einer geringeren Cytokinsekretion führen. Eine geringere Apoptose von Osteoklasten würde in diesem Modell zu einer möglicherweise verstärkten Osteolyse führen. Hennige et al. beschrieben, dass eine Fetuin-A Substitution bei Mäusen zu einer Reduzierung von Adiponektin führte (Hennige et al. 2008). Eine verminderte Adiponektinkonzentration fanden Landgräber et al. bei Patienten mit einer aseptischen Prothesenlockerung und spekulierten im Umkehrschluss, dass hohe Adiponektinkonzentrationen möglicherweise einen positiven Einfluss auf die aseptische Prothesenlockerung haben könnten (Landgräber et al. 2010). Dementsprechend könnten Fetuin-A Knock-out-Mäuse erhöhte Adiponektinkonzentrationen und eine verringerte Osteolyse aufweisen.

Ein weiterer Ansatz für den Zusammenhang zwischen Fetuin-A und der aseptischen Prothesenlockerung ergibt sich aus folgender Überlegung: Zwar gilt Fetuin-A als negatives Akut-Phase-Protein (Lebreton et al. 1979, Ombrellino et al. 2001), jedoch haben verschiedenen Studien dargelegt, dass Fetuin-A Substitution, Abriebpartikel und Prothesenlockerung mit erhöhten TNF- $\alpha$  Konzentrationen einhergehen. Hennige et al. konnten nachweisen, dass Fetuin-A bei Human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) Monozyten eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  Messenger ribonucleic acid (mRNA) induziert (Hennige et al. 2008). Kanaji et al. zeigten, dass Abriebpartikel eine Hochregulierung von TNF- $\alpha$  in Osteozyten induzieren. Das führt zu einer Entzündungsreaktion, die eine Apoptose von Osteozyten hervorruft (Kanaji et al. 2009). Bylski et al. wiesen erhöhte TNF- $\alpha$ -Werte in THP-1 Monozyten nach, die durch Partikel stimuliert worden waren (Bylski et al. 2009). Goodman et al. stellten bei einer Lockerung von zementierten Prothesen eine erhöhte TNF- $\alpha$  Expression und eine erhöhte Anzahl von T-Lymphozyten-Subgruppen fest (Goodman et al. 1998). Da TNF- $\alpha$  die Knochenresorption fördert, könnten bei Fetuin-A ausgeknockten Mäusen TNF- $\alpha$  und damit die Knochenresorption vermindert sein.

## 1.8 Fragestellung der Arbeit

In dieser Arbeit geht es um einen möglichen Einfluss von Fetuin-A auf die aseptische Prothesenlockerung. Ein direkter Zusammenhang zwischen diesem Protein und der partikelinduzierten Osteolyse ist bisher nicht bekannt und wurde noch nicht untersucht. Es wurde die Hypothese verfolgt, dass durch das Fehlen von Fetuin-A der osteolytische Vorgang reduziert werden kann und die partikelinduzierte Osteolyse geringer

ausgeprägt ist. Das könnte von klinischer Bedeutung für die Prävention einer Prothesenlockerung sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiermodell zur partikelinduzierten Osteolyse

#### 2.1.1 Versuchsprinzip

Es wurden zwanzig gesunde männliche 12 Wochen alte Mäuse mit einem Gewicht zwischen 25 und 29 Gramm untersucht. Hierbei handelte es sich jeweils um 10 C57 black 6-laboratory mice (C57BL/J6) Wildtypmäuse und 10 Fetuin-A Knock-out-Mäuse auf einem black 6 Hintergrund (B6-(HRG33)tm). Die Wildtypmäuse, im Folgenden auch Ahsg+/+ genannt, wurden vom zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen (Leiter: Prof. Dr. G. Hilken) gestellt. Die Fetuin-A Knock-out-Mäuse, im Folgenden auch Ahsg-/- genannt, wurden unter Berücksichtigung eines vergleichbaren Hintergrunds von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. rer. nat. W. Jahnen-Dechent, Direktor am Helmholtz-Institut für biomedizinische Technik der RWTH Aachen (Lehr- und Forschungsgebiet Zell- und Molekularbiologie an Grenzflächen) zur Verfügung gestellt. Der black 6 Hintergrund der Mäuse wurde zur Vergleichbarkeit mit bereits vorhandenen Studien zur partikelinduzierten Osteolyse gewählt (Wedemeyer, Neuerburg et al. 2007, Wedemeyer, Neuerburg et al. 2007, Wedemeyer, Xu et al. 2007). Die Phänotypen der Wildtyp- und der Fetuin-A Knock-out-Mäuse sind bereits in der Literatur vorbeschrieben (Jahnen-Dechent et al. 1997, Schäfer et al. 2003, The Jackson Laboratory 2014). Diese Studien zu Fetuin-A Knock-out-Mäusen haben gezeigt, dass der Phänotyp je nach Hintergrund der Mäuse variiert. Fetuin-A Knock-out-Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund zeigen eine milde Form der Calcifizierung im Vergleich zu Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit DBA/2 Hintergrund. Diese entwickelten spontan schwere Formen der ektopen Calcifizierung mit Calcium-Ablagerungen in verschiedenen Organen, unter anderem in Herz, Lunge und Nieren. Die vermehrte Calciumablagerung in den Nieren führte zusätzlich zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus (Schäfer et al. 2003). Die Fetuin-A Knock-out-Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund zeigten dagegen eine weitgehend normale Knochenmineralisierung und nur teilweise Verkalkungen der Weichteile.

Die Tiere wurden in vier Gruppen mit jeweils 5 Mäusen unterteilt (s. Anhang 7.5, Tabelle 1):

Gruppe I : Wildtypmäuse ohne Polyethylenpartikel-Implantation

Gruppe II : Wildtypmäuse mit Polyethylenpartikel-Implantation

Gruppe III : Fetuin-A Knock-out-Mäuse ohne Polyethylenpartikel-Implantation

Gruppe IV : Fetuin-A Knock-out-Mäuse mit Polyethylenpartikel-Implantation

Den Mäusen der Gruppen II und IV wurden jeweils  $6 \times 10^6$  (0,05 ml) Polyethylenpartikel auf die Schädelkalotte implantiert. Die Mäuse der Gruppen I und III bekamen nur eine Scheinoperation ohne Partikelimplantation. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert. Blut und Urin wurden analysiert (Kauther et al. 2010), die Schädelknochen mittels vorbeschriebener Mikro-Computertomographie (CT) ausgewertet (Wedemeyer et al. 2007) und abschließend eine histologische und eine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt.

### 2.1.2 Versuchstierhaltung

Das Tierexperiment wurde von der Tierschutzkommission der Landesregierung unter dem Aktenzeichen G929/07 genehmigt.

Die Versuchstiere wurden gemäß den Richtlinien der Universität Duisburg-Essen und der Landesregierung von Nordrhein-Westfalen gehalten. Ihre Haltung erfolgte standardisiert: Tag-Nacht-Rhythmus (12 Stunden hell/ 12 Stunden dunkel), Raumtemperatur  $22 \pm 2$  Grad, relative Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5$  %, Luftumwälzung 15-mal pro Stunde.

Postoperativ kamen die Mäuse in Einzelkäfige aus Kunststoff, um Stress und Infektionen zu vermeiden. Sie erhielten durchgehend Wasser und artgerechtes Trockenfutter ad libidum.

### 2.1.3 Tieranzahl

Um die notwendige Anzahl der Versuchstiere zur Überprüfung der Forschungshypothese dieser Arbeit zu bestimmen, wurde eine Power Analyse vom Department of Biostatistics der Mayo Clinic Rochester, Minnesota, USA durchgeführt. Empfohlen wurden sieben Mäuse pro Gruppe. Da vorangegangene Studien zur partikelinduzierten Osteolyse (Childs et al. 2001, Schwarz et al. 2000) und Vorarbeiten unserer Arbeits-



gruppe eine ausreichende Power bei 5 Tieren zeigten, wurden nach Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten, Dr. Philip Dammann, 5 Tiere pro Gruppe gewählt.

#### **2.1.4 Polyethylenpartikel und ihre Aufbereitung**

Für den Versuch wurden Ceridust®- Polyethylenpartikel vom Typ VP 3610 verwendet, die von der Firma Clariant (Gersthofen, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Nach Firmenangaben waren 50% der Partikel kleiner als 5 µm und 90% kleiner als 9 µm. Die Partikel wurden vom AO-Forschungsinstitut in Davos/Schweiz analysiert. Demnach waren die kleinsten Partikel 0,05 µm und die größten 11,06 µm groß. Im Mittelwert hatten die Partikel eine Größe von  $1,74 \mu\text{m} \pm 1,43 \mu\text{m}$  (Median 1,41 µm). 34% der Partikel waren kleiner als 1µm (von Knoch et al. 2004, Wedemeyer 2005).

Um Entzündungsreaktionen durch eine mögliche Verunreinigung mit Endotoxinen zu verhindern, wurden die Polyethylenpartikel vor der Implantation aufbereitet. Endotoxine sind Bestandteile von gram-negativen Bakterien und haben Wechselwirkungen mit dem Immunsystem. So könnten sie zum Beispiel verschiedene Zytokine aktivieren, die zu Entzündungen und damit zu Osteolysen in diesem Tiermodell führen könnten.

In einem ersten Schritt wurden die Polyethylenpartikel mit Ethylenoxid sterilisiert. Anschließend wurden sie in eine sterile Laminar Box gegeben. Dort wurden sie in einem Schüttelbad mit einem Lösungsmittel (70% Ethylalkohol) gewaschen. Die Polyethylenpartikel selbst sind in Ethylalkohol nicht löslich, dagegen aber anhaftende organische Rückstände wie Endotoxine. Nach Beendigung des Schüttelbads wurden die Partikel in einer Zentrifuge vom Alkohol und von den gelösten Stoffen separiert. Der ganze Vorgang wurde zweimal durchgeführt, um die Polyethylenpartikel gründlich zu reinigen. Die noch feuchten Partikel wurden sodann in einen Exsikkator, ein luftdicht verschlossenes Gefäß mit Trocknungsmittel, gegeben und getrocknet. Bei diesem Vorgang nimmt das Trocknungsmittel den von den Partikeln verdunsteten Rest-Ethylalkohol auf. Die so aufbereiteten Polyethylenpartikel wurden dann in ein endotoxinfreies Proberöhrchen (Falcon, Franklin Lakes, USA) gefüllt.

#### *Limulus Amoebocyten Assay*

Nach der Polyethylenaufbereitung wurde getestet, ob die Polyethylenpartikel tatsächlich frei von Endotoxinen sind. Die Kontrolle wurde mittels eines Limulus Amoebocyten Assays durchgeführt (s. Anhang 7.2). Dabei handelt es sich um eine qualitative Bestimmung von Endotoxinen. Dazu wird ein Limulus Amoebocyten Lysat (LAL) verwendet, das aus den Amoebocyten des Pfeilschwanzkrebses gewonnen wird. Das LAL

reagiert durch eine Enzymreaktion mit Endotoxinen gram-negativer Bakterien. Bei positivem Befund gerinnt die wässrige Lösung, und es bildet sich ein trübes, eiweißartiges Gel. Das biologische Prinzip des Limulus Amoebozyten Lysats wurde von F. Bang und J. Levin entdeckt und in den 60er Jahren veröffentlicht (Levin and Bang 1964).

## **2.2 Partikelimplantation**

### **2.2.1 Narkose und Operation**

Für die Narkose wurde den Tieren eine Natriumchloridlösung mit Ketamin (70-80 mg/kg KG) und Xylazin (5-7 mg/kg KG) intraperitoneal injiziert. Da Mäuse sehr empfindlich gegen Hypothermie sind, wurden sie anschließend auf eine Wärmeplatte (37 Grad C) gelegt. Die Augen wurden vorbeugend zum Schutz vor Austrocknung, Entzündungen oder anderen Komplikationen mit einer Augensalbe (Bepanthen Roche, Basel, Schweiz) behandelt.

Um die Schädelkalotte freizulegen, wurde den Mäusen zunächst das Kopffell rasiert und die nackte Kopfhaut sorgfältig mit Cutasept F (Bode Chemie, Hamburg, Deutschland) desinfiziert. Die Operationsbedingungen waren bei allen Versuchstieren gleich. Die Eingriffe erfolgten an einem steril abgedeckten Tisch mit sterilen Einmaloperationshandschuhen Peha Taft (Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland), Einmalskalpellen (Aeskulap, Tübingen, Deutschland), sterilen Pinzetten, scharfen Löffeln und Scheren (Luttermann, Essen, Deutschland).

Die Kopfhaut wurde auf einer Länge von etwa 10 mm längs der Mittellinie eröffnet und das Periost auf einer Fläche von circa 1 cm x 1 cm stumpf dargestellt, ohne dieses zu verletzen. Mit einem scharfen Löffel wurden 30µl der aufbereiteten sterilen Polyethylenpartikel ( $2 \times 10^8$  Partikel/1000µl) auf das Periost gegeben und gleichmäßig verteilt. Die Gruppen I und III wurden ohne Implantation von Partikeln operiert. Anschließend wurde bei allen Versuchstieren der Hautschnitt mit monofilem Ethilon-Nahtmaterial der Stärke 4.0 (Ethicon, Somerville, NJ, USA) verschlossen. Nach dem Aufwachen aus der Narkose kamen die Tiere von der Wärmeplatte wieder zurück in ihre Käfige.

Zwei Mäuse aus Gruppe III verstarben nach kurzer Zeit postoperativ auf der Wärmeplatte. Die Tiere wurden durch zwei gleichwertige Mäuse ersetzt.

### **2.2.2 Visiten**

Das Befinden der Mäuse wurde während der gesamten Versuchsdauer von 14 Tagen durch tägliche Visiten kontrolliert. Überprüft wurden der Allgemeinzustand sowie das Fress- und Trinkverhalten. Zudem wurde nachgeschaut, ob postoperative Komplikationen, wie zum Beispiel Wundheilungsstörungen, Infektionen, Blutungen der Wunde oder Augenentzündungen, aufgetreten waren. Um die Tiere nicht unnötig zu belasten, wurden die Operationsfäden nicht entfernt.

### **2.2.3 Probengewinnung – Urin und Serologie**

#### *Urin*

Vor Versuchsstart und -ende wurden die Mäuse für 12 Stunden in Stoffwechselkäfige umgesetzt, um Urinproben zu gewinnen. Der Urin in den Käfigen floss über einen Trichter ab und wurde in einem Behälter aufgefangen.

#### *Serologie*

Blutproben wurden jeweils vor der Operation und vor der Euthanasierung entnommen. Die Blutprobe von 250 µl wurde vor Versuchsbeginn unter Narkose aus dem Orbitawinkel der Mäuse gewonnen. Dazu wurden die Versuchstiere mit Isofluran leicht narkotisiert. Der Venenplexus wurde durch einen Nackengriff gestaut. Unter Drehen wurde ein Kapillarröhrchen von 0,8 mm Durchmesser am nasalen Augenwinkel eingeführt. Das Röhrchen wurde so weit vorgeschoben, bis der Venenplexus punktiert war und sich das Kapillarröhrchen mit Blut füllte. Vor dem Entfernen des Kapillarröhrchens wurde der Nackengriff gelöst, um eine Nachblutung in das Gewebe so gering wie möglich zu halten. So konnte den Mäusen bis zu 1 Prozent des Körpergewichts an Blut entnommen werden.

Die Blutentnahme vor Versuchsende erfolgte durch eine Herzpunktion. Diese Methode steht im Einklang mit der „Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren“, laut der eine Herzpunktion nur bei terminalen Experimenten durchgeführt werden soll (Gesellschaft für Versuchstierkunde 2009). Die Versuchstiere wurden narkotisiert und in überstreckter Rückenlage fixiert. Die Kanüle wurde in der Medianlinie direkt hinter dem Brustbein unter Aspiration Richtung Herz eingeführt. Bis zu 1ml Vollblut wurde gewonnen.

#### **2.2.4 Probenaufbereitung – Serologie und Urin**

Die Blut- und Urinproben jeder Maus wurden bei 3000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, separiert und dann bei -70°C bis zur laborchemischen Untersuchung eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben unverzüglich bei 37°C untersucht.

Mit dem Gerät RX Monza Analyser (Randox, Antrim, UK) wurden die Serumproben auf Gesamtcalcium, alkalische Phosphatase (AP) und anorganisches Phosphat untersucht. OPG und RANKL wurden im Serum mittels eines Immunoassays untersucht (Quantikine assays, R&D System, Minneapolis, MN, USA). Für die Bestimmung von Osteocalcin wurde ein von Immutopics erworbenes IRMA Analyseset verwendet (San Clemente, CA, USA).

Die Untersuchung der Urinproben erfolgte mit dem Analysesystem ADVIA 2400 (Siemens Medical Solutions, Fernwald, Germany). Gemessen wurden Kreatinin, Gesamtcalcium und anorganisches Phosphat. Die Messungen wurden innerhalb der ersten 2 Stunden nach Sammlung des Urins durchgeführt. Desoxypyridinolin-crosslinks (DPD) im Urin wurden mit einem DPD EIA Analyseset gemessen (Quidel, San Diego, CA, USA).

Alle Probenuntersuchungen wurden nach der Herstelleranweisung durchgeführt.

#### **2.2.5 Euthanasierung**

Die 20 Versuchstiere wurden jeweils am 14. postoperativen Tag in einer Kohlendioxidkammer euthanasiert. Dies erfolgte in einer mit 70% CO<sub>2</sub>-Gas gefüllten Kammer.

### **2.3 Präparation des Mauskopfes**

Zur Entnahme der Mäusecalvaria wurden die toten Mäuse zuerst fixiert. Mit einem Skalpell wurde im Nacken eine Stichinzision gesetzt, die mit einer spitzen Schere vorsichtig zirkulär vergrößert wurde. Anschließend wurde vorsichtig das Fell vom Unterkiefer entfernt.

Das Unterhautfettgewebe wurde stumpf eröffnet, so dass der Übergang von Occiput zur Halswirbelsäule gut dargestellt war. Die Halswirbelsäule zusammen mit der Muskulatur und dem Weichteilgewebe wurden mit einer Schere durchtrennt. Damit war der Mäusekopf präpariert für die Mikro-CT-Untersuchung.

## 2.4 Präparation der Calvaria

Nach der Mikro-CT-Untersuchung wurde die Calvaria präpariert. Dazu wurde zunächst das Kopffell kurz geschnitten. Durch stumpfe Präparation wurde der Processus mandibularis beidseitig dargestellt und durchtrennt. Dadurch konnte der gesamte Unterkiefer zusammen mit Zunge, Pharynxmuskulatur und Trachea entfernt werden. Das Kopffell wurde vorsichtig soweit abpräpariert, dass die anatomischen Knochenstrukturen zur Entfernung der Schädelbasis gut sichtbar wurden. Das Fell über der Calvaria blieb davon unangetastet, so dass das neu entstandene Granulationsgewebe im Operationsbereich später mit untersucht werden konnte. Anschließend wurde die Klinge einer geöffneten spitzen Schere in das Foramen magnum zwischen Knochen und Hirnsubstanz eingeführt. Dann wurde die Schädelbasis entlang der Medianlinie Richtung Nase durchtrennt. Anschließend wurde beidseitig entlang des Übergangs zwischen Parietalknochen und der Schädelbasis auf Höhe des Meatus acusticus externus geschnitten. Die Schädelbasis wurde mit einer Pinzette entfernt, ebenso das nun offen liegende Gehirn. Der präparierte Knochen samt Kopffell wurde in eine Schaffer'sche Lösung gegeben (1440ml Methanol, 750ml Formalin 40% neutral und 60ml Puffer (9,6g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,74g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 30,8g Glucose; ad 1l Aqua dest.)).

## 2.5 Mikro-Computertomographie

Zur Analyse der Präparate wurde das Verfahren der Mikro-Computertomographie gewählt, weil es eine zerstörungsfreie dreidimensionale Darstellung von kleinen Objekten mit hoher Ortsauflösung ermöglicht. Sie liegt zwischen 5 und 50  $\mu\text{m}$ . Zugleich liefert das Verfahren Messdaten zur Dichteverteilung des Materials. Verwendet wurde ein X-Ray Microtomograph vom Typ Skyscan 1072 (Skyscan, Aartselaar, Belgien), das Prof. Dr. B. Levkau, Pathophysiologie des Uniklinikums Essen, zur Verfügung stellte (s. Anhang 7.1., Abb. 9).

### 2.5.1 Verfahren der Mikro-Computertomographie

Bei der Mikro-Computertomographie werden parallele Röntgenstrahlen genutzt, um eine Vielzahl von zweidimensionalen Bildern eines Objektes aus unterschiedlichen Winkeln herzustellen. Dabei werden die Strahlen, die durch das zu untersuchende Objekt geschickt werden, hinter dem Objekt von Detektoren aufgezeichnet. Der Vergleich von ausgesandter und ankommender Strahlenintensität gibt Aufschluss über die Ab-

schwächung der Strahlung durch das Objekt. So können beispielsweise Dichteverteilungen und Materialstrukturen erkannt und dargestellt werden. Aus der Serie von Schnittbildern kann dann rechnergestützt die dreidimensionale Struktur des Objekts rekonstruiert werden. Die Querschnitte können im Mikro-CT eine Schichtdicke von nur 5  $\mu\text{m}$  erreichen.

Der Microtomograph Skyscan 1072 besteht aus einem Röntgen-Mikroskop-System (Scanner) sowie einem Computer zur Steuerung des Geräts und zur Bildrekonstruktion. In dem Scanner sind eine Mikrofokusröntgenröhre und ein Charge-Coupled-Device (CCD)-Detektor installiert. Dazwischen befindet sich auf einer drehbaren Achse der Probeschlitzen. Im Gegensatz zu konventionellen Computertomographen dreht sich also das Objekt.

In dieser Studie wurde eine Mikrofokusröhre mit einer Ortsauflösung von 8  $\mu\text{m}$  verwendet. Um eine gute Darstellung der Knochen zu erreichen, wurden für die elektrische Spannung der Röntgenröhre 81 kV und für die Stromstärke 100  $\mu\text{A}$  gewählt. Der CCD-Detektor verfügt über eine Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und ermöglicht 1024 Querschnitte pro Objekt. In dieser Studie wurden pro Präparat rund 970 Querschnitte erstellt. Die Schädelknochen wurden mit einer 19,23-fachen Vergrößerung digitalisiert. Zur Fixierung wurden die Schädelknochen jeweils in ein Kunststoffröhrchen eingeführt, das mit Knetmasse auf dem Probeschlitzen befestigt wurde. Dieser kann um seine eigene Längsachse rotieren und entlang dieser bewegt werden. Die Gesamtrotation betrug 180°, der Rotationswinkel 0,9° und die Belichtungszeit 4,9 Sekunden. Bei den Rekonstruktionseinstellungen wurde ein Schwellenwert von 20% gewählt.

Zur Überprüfung der korrekten Positionierung des Präparats, also der Übereinstimmung der Längsachse des Schädelknochens mit der Längsachse des Probeschlitzens, wurde zunächst ein Übersichtsbild angefertigt (s. Anhang 7.1, Abb. 1+2). Für die Schnittbilder wurden dann entsprechend den Rotationswinkeln 200 Aufnahmen gemacht, die als 16 bit Tagged image file format (TIF) Dateien gespeichert wurden.

### **2.5.2 Rekonstruktion der Mikro-CT-Bilder**

Anschließend wurden die digitalisierten Röntgenbilder der Schädelknochen mit dem Softwareprogramm „Cone Beam Reconstruction“ (Skyscan, Aartselaar, Belgien) bearbeitet, um Querschnitte zu rekonstruieren. Dazu wurde zunächst der zu analysierende Bereich des Schädelknochens auf seiner Längsachse ausgewählt. Dieser wurde auf der Skala zwischen 0 und 1023 auf die Werte 23 bis 997 festgelegt. Zudem wurden Probequerschnitte erstellt, um die optimale Einstellung für die Darstellung in Graustu-

fen festzulegen. Für den Filter ergaben sich so ein minimaler und ein maximaler Wert (0,308 / 0,522). Damit konnte das Knochengewebe der Mäusepräparate besonders gut dargestellt werden. Alle Werte, die unter dem Minimalwert liegen, erscheinen weiß, alle Werte, die über dem Maximalwert liegen, erscheinen schwarz. Der Bereich dazwischen wird in 256 Graustufen dargestellt.

Auf der Basis der einzelnen 2D-Schnittbilder wurden anschließend mit einem Oberflächen- und Volumen-Renderingverfahren 3D-Bilder der Mäuseschädel angefertigt, um die Schädelknochenstruktur in den verschiedenen Versuchsgruppen anschaulich darzustellen und Einblicke in Strukturen zu geben, die vorher nicht sichtbar waren.

Wie die zweidimensionalen wurden auch die dreidimensionalen Rekonstruktionen für die dauerhafte Erfassung der Proben und die Archivierung digital gespeichert.

### 2.5.3 Analyseverfahren

Die rekonstruierten Querschnittsbilder wurden mit dem Programm CT-Analyser (Skyscan, Aartselaar, Belgien) bearbeitet. Dieses Programm berechnet das Bonevolume (BV) und das relative Knochenvolumen, also das Verhältnis von Bonevolume (BV) zu Tissuevolume (TV). Für diese Berechnung wurden 2,00 mm<sup>3</sup> große Würfel, so genannte Cubes verwendet. Pro Schädelknochen waren es insgesamt 5 Stück. Diese wurden im Operationsgebiet zur Hälfte überschneidend entlang der Mittelliniensutur des jeweiligen Mäuseschädels platziert. Die Cubes wurden von der Occipitalsutur Richtung frontal gesetzt und umfassten so ein Volumen von 2x2x6mm<sup>3</sup>. In diesem Bereich ist die Mauscalvaria annähernd eben, so dass ein schräges Anschneiden der Calvaria nach lateral vermieden wird.

Für die genaue Positionierung jedes einzelnen Cubes wurde zunächst eine „Region of Interest“ (ROI) in einem Querschnittsbild so festgelegt, dass die Mittelliniensutur im Zentrum war (s. Anhang 7.1, Abb. 3+4). Mit dem CT-Analyser wurden dann pro Cube 100 ROIs miteinander verbunden (s. Anhang 7.1, Abb. 5+6) und ein „Volume of Interest“ (VOI) erzeugt (s. Anhang 7.1, Abb. 7+8).

Bei allen Schädelknochen, das heißt sowohl bei denen mit, als auch bei denen ohne Partikelimplantation, wurden die Cubes immer an den gleichen Stellen entlang der Mittelliniensutur positioniert.

## **2.6 Histologische Aufbereitung**

Zur histologischen Aufbereitung wurden die Schädelkalotten entkalkt, entwässert, in Paraffin gebettet und anschließend über der Mittelliniensutur in der Frontalebene in 4 µm dünne Scheiben geschnitten (s. Anhang 7.3). Um das Ausmaß der Osteolyse festzustellen, wurden zwei verschiedene Färbungen vorgenommen. Mittels einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurde das Ausmaß der Resorptionszone gemessen, mittels einer Tartrat-resistent acid phosphatase (TRAP)-Färbung die Anzahl der Osteoklasten pro Gesichtsfeld bestimmt.

### **2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gehört zu einer der am häufigsten durchgeführten Färbungen für histologische Schnitte. Bei der Färbung wurden in einem ersten Schritt saure Moleküle durch das Hämatoxilin gefärbt. Dadurch erschienen die Zellkerne blau. In einem zweiten Schritt wurde die Gegenfärbung mit Eosin durchgeführt. Dadurch wurden eosinophile Moleküle rot gefärbt, dazu gehörten Zytoplasma und Kollagen (s. Anhang 7.4.1).

### **2.6.2 TRAP-Färbung**

Zur lichtmikroskopischen Darstellung der Osteoklasten wurden TRAP-Färbungen vorgenommen. Dies ist eine immunhistochemische Färbungsmethode, bei der Enzyme durch Antikörper dargestellt werden.

Das spezielle Enzym TRAP wird von Osteoklasten ab der Differenzierungsphase an der Oberfläche sezerniert. TRAP ist somit ein Markerenzym von Osteoklasten und damit auch ein Marker des Knochenabbaus.

Durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion wird das Enzym nachgewiesen. Dazu wird ein bestimmter Antikörper genutzt, der sich gegen TRAP richtet. Zur Dedektion des so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes wird der Antikörper mit einem weiteren farbstoffmarkierten Antikörper gekoppelt. So erscheinen alle TRAP-aktiven Osteoklasten rot (s. Anhang 7.4.2).

## **2.7 Auswertungsverfahren der histologischen Präparate**

Die gefärbten histologischen Schnitte wurden durch ein Lichtmikroskop von Nikon Eclipse 80i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) betrachtet und ausgewertet. Die vergrößerten



ten Ausschnitte wurden mit der an dem Mikroskop montierten Kamera Nikon CCD-1300 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) fotografiert und die Bilder im Computer abgespeichert. Deren Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm NIS Elements AR 3.0 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland), bei dem zur späteren Größenbestimmung ein skaliertes Millimetermaß eingefügt wurde.

### **2.7.1 Qualitative Bildbeschreibung**

Die gefärbten histologischen Schnitte wurden zunächst unter dem Lichtmikroskop bei kleinster Vergrößerung betrachtet. Die Farbqualität wurde geprüft und ein erster Eindruck über die Gliederung des jeweiligen Präparates gewonnen. Dabei wurden die Schichten der Gewebearten unterschieden. Auch die Mittelliniensuturfläche wurde ausgiebig betrachtet und analysiert. Bei den höheren Vergrößerungen wurde das ganze Schnittbild systematisch in Hinblick auf die Verteilung der Gewebearten und der Zelltypen sowie auf die Mittelliniensuturfläche betrachtet.

### **2.7.2 Quantitative Bildbeschreibung**

Um das Ausmaß der Osteolyse und die Gewebeverteilung beurteilen zu können, wurden histomorphometrische Daten erhoben. Damit ein einheitliches und reproduzierbares Ergebnis erzielt wird, wurde die jeweilige Mittelliniensutur im Gesichtsfeld zentriert. Außer bei den Osteoklasten (TRAP-Färbung) wurden HE-gefärbte histologische Schnitte zur Auswertung genutzt. Für jede Maus sowie jede Gruppe wurden die Mittelwerte berechnet.

Die histomorphometrischen Daten wurden nach der internationalen Klassifikation von Parfitt et al. 1987 angegeben (Parfitt et al. 1987). Eine Ausnahme bildet die Mittelliniensuturfläche; sie wurde nach Schwarz et al. 2000 definiert (Schwarz et al. 2000).

#### *Mittelliniensuturfläche*

Die Mittelliniensutur, auch Sutura sagittalis genannt, ist die Nahtstelle zwischen den beiden Parietalknochen. Dieser Bereich eignet sich besonders gut zum quantitativen Nachweis osteolytischer Aktivität (Wedemeyer 2005). Nach Schwarz et al. 2000 umfasst die Mittelliniensuturfläche bei 6-8 Wochen alten Mäusen eine Fläche von  $50 \pm 6 \mu\text{m}^2$  mit durchschnittlich 5 Osteoklasten (Schwarz et al. 2000).

Bei einer 40-fachen Vergrößerung wurde die Resorptionsfläche in den HE-gefärbten Schnitten ausgemessen.

#### *Osteoklastenanzahl*

Die durch die TRAP-Färbung rötlichen Osteoklasten wurden in 200-facher Vergrößerung pro Gesichtsfeld gezählt. Die Osteoklasten mussten nicht zwangsläufig mehrkernig erscheinen, da im histologischen Schnitt auch nur ein Kern sichtbar sein kann.

## **2.8 Statistik**

### **2.8.1 Normalverteilung**

Aus vorangegangenen Studien ist eine Normalverteilung von untersuchten Laborparametern, BV, BV/TV und Mittelliniensuturfläche bekannt. Ein zusätzlich durchgeführter Kolmogorov-Smirnov-Test der untersuchten Parameter konnte eine Nicht-Normalverteilung ausschließen.

### **2.8.2 ANOVA**

Analysis of variance (ANOVA) ist eine Varianzanalyse, deren Grundlagen von R.A. Fisher entwickelt wurden. In dieser Studie wurde ein zweifaktorieller ANOVA-Test durchgeführt, um den möglichen Einfluss der Partikel (main effect), der Gruppe (main effect) oder der Kombination aus Partikeln und Gruppe (interaction effect) zu untersuchen. Mit dem statistischen Verfahren ANOVA wurde die Varianz der experimentell erhobenen Daten innerhalb jeder einzelnen Mausgruppe sowie die Varianzen zwischen den vier Mausgruppen analysiert. Die Methode basiert auf der Untersuchung von Mittelwerten und ihren Standardabweichungen. Dabei werden sowohl die Abweichungen der einzelnen Messwerte innerhalb einer Mausgruppe vom Gruppenmittelwert, als auch die Abweichung der Gruppenmittelwerte vom Gesamtmittelwert über alle vier Mausgruppen analysiert (Ludwig-Mayerhofer 2010). Sind die Unterschiede zwischen den Gruppen relativ groß, ist die Varianz innerhalb der Gruppen dagegen aber gering, lässt das darauf schließen, dass die Gruppenzugehörigkeit einen Einfluss auf die abhängige Variable, das heißt in dieser Studie, auf das Ausmaß der Osteolyse hat (Elsner 2009).

### 2.8.3 T-Test

Beim Nachweis signifikanter Unterschiede im zweifaktoriellen ANOVA wurde zum Vergleich einzelner Gruppen ein Statistical hypothesis (T)-Test durchgeführt, bei dem die vier Mausgruppen als unabhängige Stichproben paarweise in Bezug auf das Ausmaß der Osteolyse, das Verhältnis von Knochen- und Gewebenvolumen (BV/TV) sowie das Knochenvolumen (BV) untersucht wurden. Mit dem Zweistichproben-Test wurden die durch das Experiment gewonnenen Daten auf Unterschiede hin analysiert. Dabei ging es darum, ob ein Unterschied zwischen zwei Gruppen als zufällig oder als signifikant einzustufen ist (Elsner 2009). Für die Signifikanzniveaus gilt: Bei  $p > 0,05$  ist ein Ergebnis nicht signifikant (n.s.), bei  $p \leq 0,05$  (\*) ist es signifikant, bei  $p \leq 0,01$  (\*\*) ist es sehr signifikant und bei  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) hoch signifikant. Dieser Test wurde auch bei der Auswertung der Urin- und Blutproben durchgeführt.

Zur Vermeidung des Problems des multiplen Testens der Parameter in der Mikro-CT und Histomorphometrie wurde nur bei signifikanten Unterschieden in der ANOVA eine T-Testung mit Paarvergleichen durchgeführt. Der signifikante Unterschied von Gruppe 1 vs. Gruppe 2 (Kontrollgruppe) ist bereits aus Vorversuchen bekannt, so dass als neue statistische Testung ein Paarvergleich von Gruppe 3 vs. Gruppe 4 und Gruppe 2 vs. Gruppe 4 durchgeführt wurde. Bei fehlender Signifikanz des „interaction effects“ der ANOVA wurden die T-Testungen explorativ durchgeführt und Mittelwert, Standardabweichung und p-Wert deskriptiv ohne Bezeichnung von „signifikanten“ Unterschieden genannt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Versuchstiere

##### 3.1.1 Tägliche Visiten

Bei den täglichen postoperativen Visiten wurden bei den Tieren während der gesamten Versuchsdauer von 14 Tagen keine Auffälligkeiten festgestellt. Sie waren in einem guten Allgemeinzustand, ihr Ess- und Trinkverhalten war unauffällig. Es traten keine postoperativen Komplikationen auf, wie zum Beispiel Wundheilungsstörungen, Infektionen, Blutungen der Wunde oder Augenentzündungen.

##### 3.1.2 Präparation

Bei der Präparation der Schädelkalotten fiel auf, dass das Weichteilgewebe der Fetuin-A Knock-out-Mäuse im Vergleich zu dem der Wildtypmäuse verhärtet war.

#### 3.2 Biochemische Untersuchung

##### 3.2.1 Vergleich der präoperativen Werte

Die Werte von OPG waren bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen signifikant höher als bei den Wildtypmäusen (OPG  $2036,28 \pm 53,74$  pg/ml vs  $1685,31 \pm 222,03$  pg/ml,  $n=10$ ,  $p \leq 0,01$ ). Die Werte für AP und Calcium waren bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen signifikant niedriger als bei den Wildtypmäusen (AP  $186,4 \pm 28,12$  U/l vs.  $340,4 \pm 20,18$  U/l,  $n=10$ ,  $p \leq 0,001$ ; Calcium  $1,72 \pm 0,16$  mmol/l vs  $2,26 \pm 0,11$  mmol/l,  $n=10$ ,  $p \leq 0,0001$ ). Bei den übrigen Parametern, die untersucht wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (s. Anhang 7.5, Tabelle 2a+2b). Die Werte von Osteocalcin, Phosphat und DPD/Kreatinin waren bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen tendenziell niedriger als bei den Wildtypmäusen (Osteocalcin  $82,78 \pm 15,24$  ng/ml vs.  $115,87 \pm 11,47$  ng/ml,  $n=10$ ; Phosphat  $5,03 \pm 0,44$  mg/dl vs.  $5,22 \pm 0,7$  mg/dl,  $n=10$ ; DPD/Kreatinin  $13,8 \pm 0,43$  nmol/mmol vs  $15,47 \pm 2,22$  nmol/mmol,  $n=10$ ). Die Serumwerte von RANKL und OPG/RANKL waren bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen vergleichsweise höher als bei den Wildtypmäusen (RANKL  $96,05 \pm 28,31$  pg/ml vs.  $95,42 \pm 24,69$  pg/ml,  $n=10$ ; OPG/RANKL  $23,88 \pm 6,84$  pg/ml vs.  $19,16 \pm 5,58$  pg/ml,  $n=10$ ).

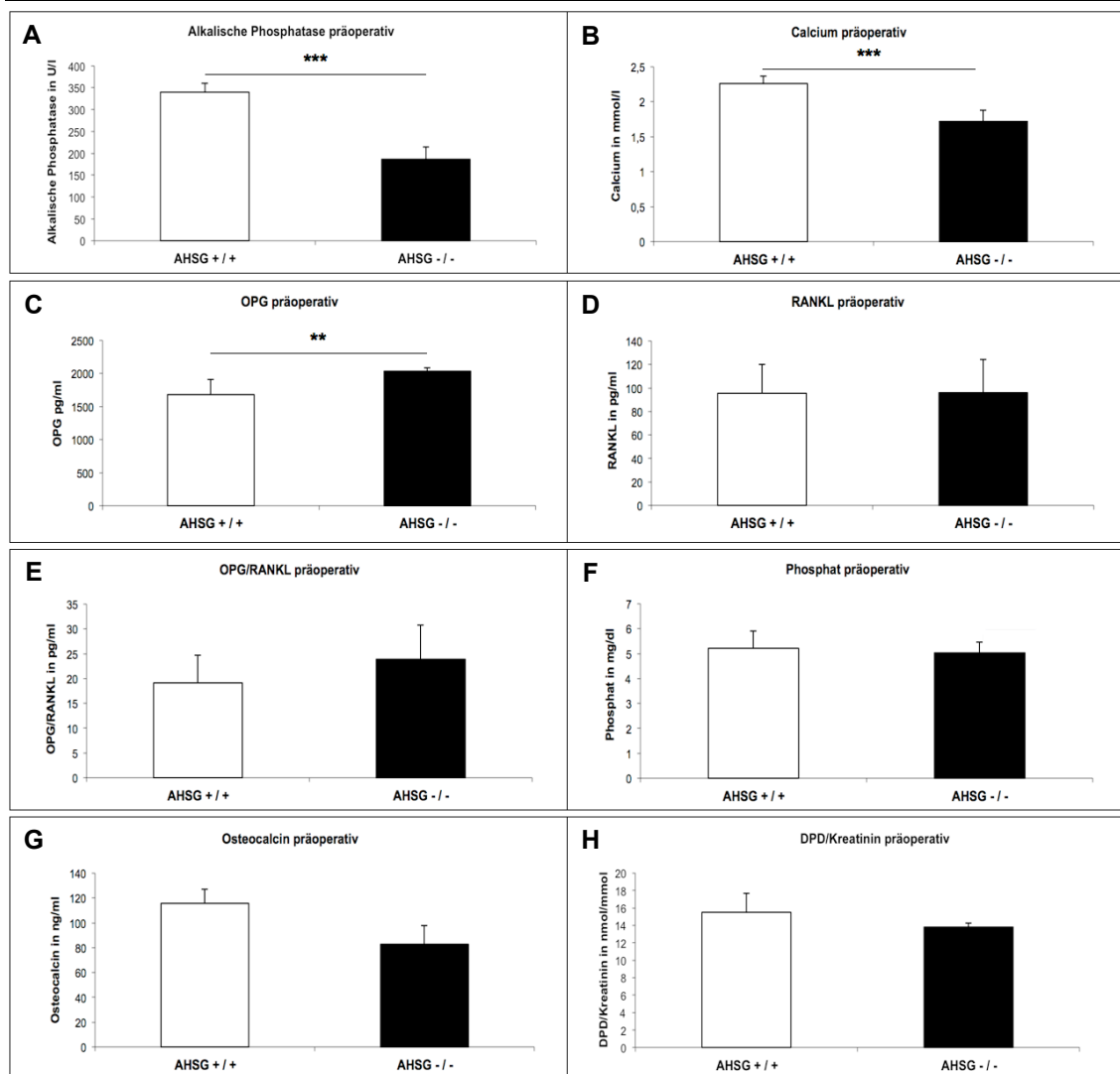


Abbildung 1: Vergleich der präoperativen Laborwerte von Wildtypmäusen und Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit der dazu gehörigen Standardabweichung.

(A)-(G) Die Serumwerte der Wildtyp- und Fetuin-A Knock-out-Mäuse wurden aus den Blutproben bestimmt, die präoperativ aus dem Orbitawinkel der Mäuse gewonnen worden waren.

(A) Alkalische Phosphatase in U/l wurde mittels RX Monza Analyser bestimmt.

(B) Calcium in mmol/l wurde mittels RX Monza Analyser bestimmt.

(C) OPG in pg/ml wurde mittels Immunoassays bestimmt.

(D) RANKL in pg/ml wurde mittels Immunoassays bestimmt.

(E) OPG/RANKL in pg/ml wurde aus den erhobenen Daten von OPG und RANKL ermittelt.

(F) Phosphat in mg/dl wurde mittels RX Monza Analyser bestimmt.

(G) Osteocalcin in ng/ml wurde mittels IRMA Analyseset bestimmt.

(H) Die Urinproben der Mäuse wurden über einen Zeitraum von 12 Stunden präoperativ in Stoffwechselkäfigen gesammelt und anschließend ausgewertet. Kreatinin wurde mittels ADVIA 2400 gemessen. DPD wurde mit einem DPD EIA Analyseset gemessen. Anschließend wurde DPD/Kreatinin in nmol/mmol errechnet.

(\*\*\* (p<0,001), \*\* (p<0,01), \* (p<0,05))

### 3.2.2 Vergleich der prä- und postoperativen Werte

Bei Gruppe I, den Wildtypmäusen mit Scheinoperation, zeigte sich ein signifikanter Abfall der Werte von OPG/RANKL ( $18,02 \pm 2,63$  pg/ml vs.  $12,04 \pm 2,15$  pg/ml,  $n=5$ ,  $p \leq 0,008$ ), Osteocalcin ( $116,09 \pm 11,97$  ng/ml vs.  $63,07 \pm 15,83$  ng/ml,  $n=5$ ,  $p \leq 0,0007$ ) und AP ( $353,58 \pm 20,55$  U/l vs.  $253,30 \pm 52,71$  U/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,008$ ). Ein signifikanter Anstieg dagegen ergab sich bei den Werten von RANKL ( $99,77 \pm 17,64$  pg/ml vs.  $138,04 \pm 16,63$  pg/ml,  $n=5$ ,  $p \leq 0,05$ ), DPD/Kreatinin ( $14,53 \pm 1,26$  nmol/mmol vs.  $18,96 \pm 1,99$  nmol/mmol,  $n=5$ ,  $p \leq 0,05$ ), Phosphat ( $5,41 \pm 0,66$  mg/dl vs.  $12,48 \pm 1,18$  mg/dl,  $n=5$ ,  $p \leq 0,00001$ ) und Calcium ( $2,27 \pm 0,12$  mmol/l vs.  $2,87 \pm 0,16$  mmol/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,001$ ). In Gruppe II, den Wildtypmäusen mit Partikelimplantation, ergaben sich nur signifikante Werte bei DPD/Kreatinin ( $16,41 \pm 3,18$  nmol/mmol vs.  $23,82 \pm 3,10$  nmol/mmol,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ), Phosphat ( $5,03 \pm 0,73$  mg/dl vs.  $12,05 \pm 1,47$  mg/dl,  $n=5$ ,  $p \leq 0,001$ ) und Calcium ( $2,25 \pm 0,10$  mmol/l vs.  $3,02 \pm 0,39$  mmol/l,  $n=5$ ,  $p < 0,01$ ). Sie stiegen postoperativ deutlich an.

Der postoperative Vergleich der beiden Wildtypmäusegruppen zeigte einen signifikanten Anstieg von Osteocalcin ( $105,73 \pm 24,23$  mg/ml vs.  $63,07 \pm 15,83$  mg/ml,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ) und DPD/Kreatinin ( $23,82 \pm 3,10$  nmol/mmol vs.  $18,96 \pm 1,99$  nmol/mmol,  $n=5$ ,  $p \leq 0,05$ ) bei den Wildtypmäusen mit Partikelimplantation im Vergleich zu den scheinoperierten Mäusen. Bei den anderen Parametern ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, auch nicht beim Vergleich der präoperativen Werte.

In Gruppe III, den Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit Scheinoperation, zeigte sich ein signifikanter Abfall der Werte von AP ( $190,50 \pm 28,48$  U/l vs.  $94,60 \pm 9,29$  U/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,001$ ). Die Werte von DPD/Kreatinin ( $12,37 \pm 0,85$  nmol/mmol vs.  $15,86 \pm 1,02$  nmol/mmol,  $n=5$ ,  $p \leq 0,01$ ), Phosphat ( $4,80 \pm 0,64$  mg/dl vs.  $12,42 \pm 3,03$  mg/dl,  $n=5$ ,  $p \leq 0,01$ ) und Calcium ( $1,74 \pm 0,14$  mmol/l vs.  $2,86 \pm 0,30$  mmol/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,001$ ) stiegen signifikant an.

In Gruppe IV, den Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit Partikelimplantation, sanken die Werte von AP ( $182,30 \pm 27,75$  U/l vs.  $101,53 \pm 41,48$  U/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,05$ ) signifikant. Ein hoch signifikanter Anstieg ergab sich bei den Messwerten von Phosphat ( $5,26 \pm 0,24$  mg/dl vs.  $12,24 \pm 0,86$  mg/dl,  $n=5$ ,  $p \leq 0,0001$ ) und Calcium ( $1,69 \pm 0,18$  mmol/l vs.  $2,98 \pm 0,05$  mmol/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,0002$ ).

Der Vergleich der Werte von Gruppe III und IV ergab sowohl prä- als auch postoperativ nur ein signifikantes Ergebnis. Postoperativ stieg der Wert von RANKL bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit Partikelimplantation hoch signifikant an ( $94,51 \pm 7,07$  pg/ml vs  $122,16 \pm 2,58$  pg/ml,  $n=5$ ,  $p \leq 0,0006$ ).

Beim Vergleich der beiden scheinoperierten Gruppen (Gruppe I und III) hatten die Fetuin-A Knock-out-Mäuse prä- und postoperativ niedrigere Werte von DPD/Kreatinin, Phosphat, Calcium und AP. Dieser Unterschied stellte sich aber nur bei DPD/Kreatinin postoperativ ( $18,96 \pm 1,99$  nmol/mmol vs.  $15,86 \pm 1,02$  nmol/mmol,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ), bei Calcium präoperativ ( $2,27 \pm 0,12$  mmol/l vs.  $1,74 \pm 0,14$  mmol/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,0006$ ) sowie bei AP präoperativ ( $353,58 \pm 20,55$  U/l vs.  $190,50 \pm 28,48$  U/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,001$ ) und postoperativ ( $253,30 \pm 52,71$  U/l vs  $94,60 \pm 9,29$  U/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,01$ ) als signifikant heraus. Insgesamt höhere prä- und postoperative Werte hatten die Fetuin-A Knock-out-Mäuse ohne Partikelimplantation (Gruppe III) im Vergleich zu den Wildtypmäusen ohne Partikelimplantation (Gruppe I) bei OPG und OPG/RANKL. Jedoch stellten sich die Werte nur bei dem präoperativ abgenommenen OPG ( $2074,09 \pm 94,58$  pg/ml vs.  $1757,82 \pm 146,62$  pg/ml,  $n=5$ ,  $p \leq 0,01$ ) und postoperativ abgenommenen OPG/RANKL ( $20,08 \pm 3,32$  pg/ml vs.  $12,04 \pm 2,15$  pg/ml,  $n=5$ ,  $p \leq 0,01$ ) als signifikant heraus. Bei Osteocalcin und RANKL verhielt es sich anders. RANKL war präoperativ höher und postoperativ ( $94,51 \pm 7,07$  pg/ml vs.  $138,04 \pm 16,63$  pg/ml,  $n=5$ ,  $p \leq 0,01$ ) signifikant niedriger bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Bei Osteocalcin war es genau anders herum. Dort waren die präoperativen Werte niedriger und stiegen postoperativ, aber nicht signifikant.

Beim Vergleich der beiden partikelimplantierten Mäusegruppen (Gruppe II und IV) waren die Werte prä- und postoperativ von OPG, OPG/RANKL und Phosphat bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen höher als bei den Wildtypmäusen. Die Werte waren jedoch nicht signifikant erhöht. Niedrigere Werte prä- und postoperativ zeigten die Fetuin-A Knock-out-Mäuse (Gruppe IV) im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Gruppe II) bei RANKL, Osteocalcin, DPD/Kreatinin, Calcium und AP. Ein signifikantes Ergebnis ergab sich bei den Werten für DPD/Kreatinin postoperativ ( $16,72 \pm 3,14$  nmol/mmol vs.  $23,82 \pm 3,10$  nmol/mmol,  $n=5$ ,  $p \leq 0,05$ ), für Calcium präoperativ ( $1,69 \pm 0,18$  mmol/l vs.  $2,25 \pm 0,10$  mmol/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,01$ ) sowie für AP präoperativ ( $182,30 \pm 27,75$  U/l vs.  $327,22 \pm 19,81$  U/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,001$ ) und postoperativ ( $101,53 \pm 41,48$  U/l vs.  $263,46 \pm 64,45$  U/l,  $n=5$ ,  $p \leq 0,05$ ).

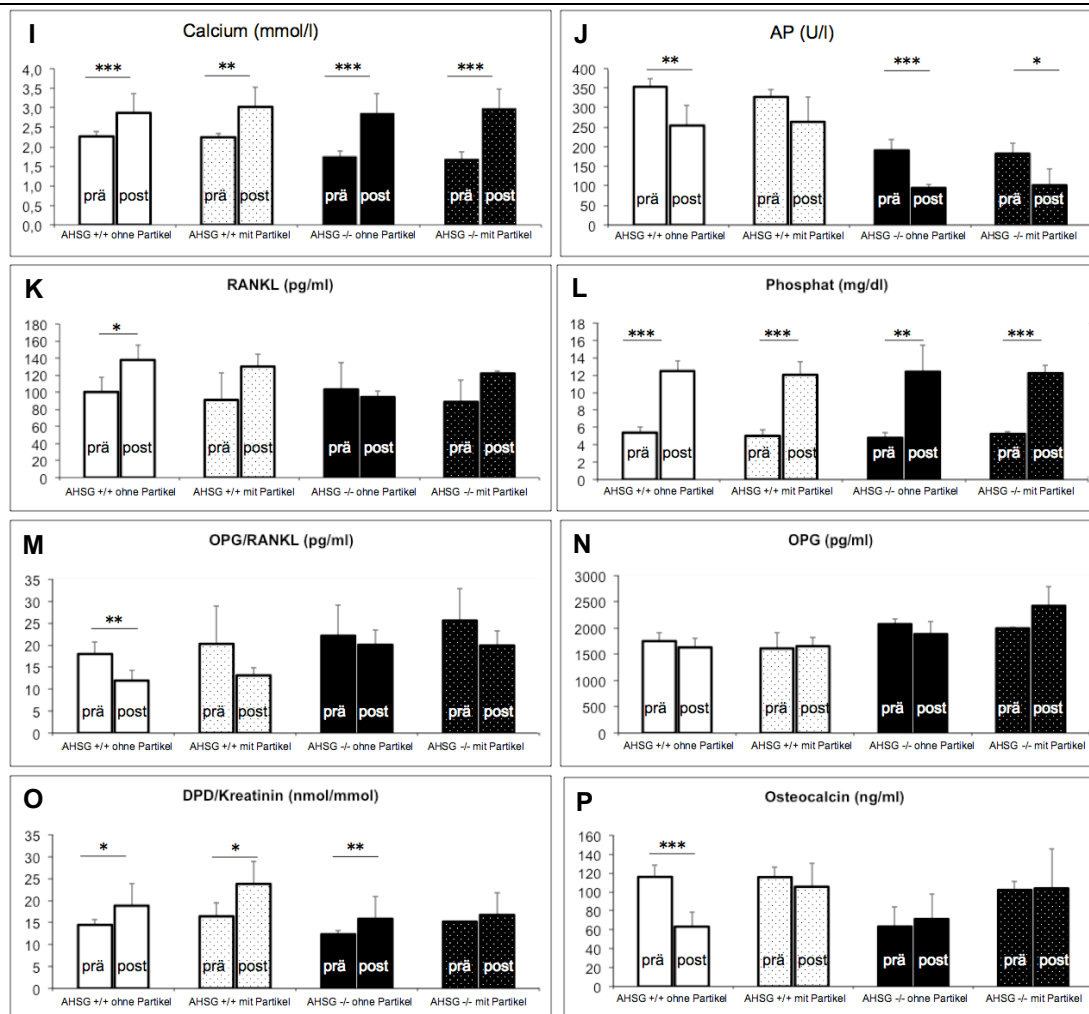


Abbildung 2: Vergleich der prä- und postoperativen Werte der vier Mausgruppen mit der dazu gehörigen Standardabweichung.

(I)-(O) Die präoperativen Serumwerte der Wildtyp- und Fetuin-A Knock-out-Mäuse wurden aus den Blutproben bestimmt, die präoperativ aus dem Orbitawinkel der Mäuse gewonnen worden waren. Die postoperativen Serumwerte wurden aus den Blutproben bestimmt, die vor der Euthanasierung (14 Tage nach der Operation) durch eine Herzpunktion gewonnen worden waren.

(I) Alkalische Phosphatase in U/l wurde mittels RX Monza Analyser bestimmt.

(J) Calcium in mmol/l wurde mittels RX Monza Analyser bestimmt.

(K) OPG in pg/ml wurde mittels Immunoassays bestimmt.

(L) RANKL in pg/ml wurde mittels Immunoassays bestimmt.

(M) OPG/RANKL in pg/ml wurde aus den erhobenen Daten von OPG und RANKL ermittelt.

(N) Phosphat in mg/dl wurde mittels RX Monza Analyser bestimmt.

(O) Osteocalcin in ng/ml wurde mittels IRMA Analyseset bestimmt.

(P) Die Urinproben der Mäuse wurden über einen Zeitraum von 12 Stunden präoperativ und postoperativ in Stoffwechselkäfigen gesammelt und dann ausgewertet. Kreatinin wurde mittels ADVIA 2400 gemessen. DPD wurde mit einem DPD EIA Analyseset gemessen. Danach wurde DPD/Kreatinin in nmol/mmol errechnet.

(\*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ))



### 3.3 Analyse der Mikro-CT-Daten

#### 3.3.1 Analyse von BV/TV und BV

Bei der Analyse von BV/TV und BV zeigte der ANOVA-Test einen signifikanten Einfluss der Partikel ( $n=5$ , BV/TV  $p \leq 0,0001$ , BV  $p \leq 0,001$ ) und der Gruppe ( $n=5$ , BV/TV  $p \leq 0,0001$ , BV  $p \leq 0,002$ ). Im Bezug auf Gruppe und Partikel ergab sich keine Signifikanz (BV/TV  $p=0,49$ , BV  $p=0,93$ ).

BV/TV und BV waren größer in scheinooperierten Wildtypmäusen (Gruppe I) als in Wildtypmäusen mit Partikelimplantation (Gruppe II) (BV/TV  $6.25 \pm 0.17$  % vs.  $6.00 \pm 0.09$  %,  $n=5$ ,  $p \leq 0.05$ ; BV  $0.54 \pm 0.02$  mm<sup>3</sup> vs.  $0.52 \pm 0.01$  mm<sup>3</sup>,  $n=5$ ,  $p \leq 0.05$ ). Bei den Ahsg -/- Mäusen waren BV/TV und BV in den scheinooperierten Mäusen (Gruppe III) größer als bei den Ahsg -/- Mäusen mit Partikelimplantation (Gruppe VI) (BV/TV  $6.03 \pm 0.03$  % vs.  $5.71 \pm 0.09$  %,  $n=5$ ,  $p \leq 0.0001$ ; BV  $0.53 \pm 0.01$  mm<sup>3</sup> vs.  $0.50 \pm 0.01$  mm<sup>3</sup>,  $n=5$ ,  $p \leq 0.01$ ).

Der Vergleich von scheinooperierten Wildtypmäusen und Ahsg -/- Mäusen zeigte, dass die Ahsg -/- Mäuse (Gruppe III) ein geringeres BV/TV als die Wildtypmäuse (Gruppe I) aufwiesen (BV/TV  $6.03 \pm 0.03$  % vs.  $6.25 \pm 0.17$  %,  $n=5$ ,  $p \leq 0.05$ ). Das BV war auch geringer (BV  $0.53 \pm 0.01$  mm<sup>3</sup> vs.  $0.54 \pm 0.02$  mm<sup>3</sup>,  $n=5$ ,  $p = 0.068$ ).

Im Vergleich der beiden Mäusegruppen mit Partikelimplantation zeigte sich eine stärkere Osteolyse bei den Ahsg -/- Mäusen (Gruppe IV) als bei den Wildtypmäusen (Gruppe II) (BV/TV  $5,71 \pm 0.09$  % vs.  $6.00 \pm 0.09$  %,  $n=5$ ,  $p \leq 0.001$ ; BV  $0,50 \pm 0.01$  mm<sup>3</sup> vs.  $0.52 \pm 0.01$  mm<sup>3</sup>,  $n=5$ ,  $p \leq 0.01$ ).

Das somit auffälligste Ergebnis zeigten die Fetuin-A Knock-out-Mäuse mit Partikelimplantation. Die Osteolyse war bei ihnen am ausgeprägtesten (s. Anhang 7.5, Tabelle 5+6).

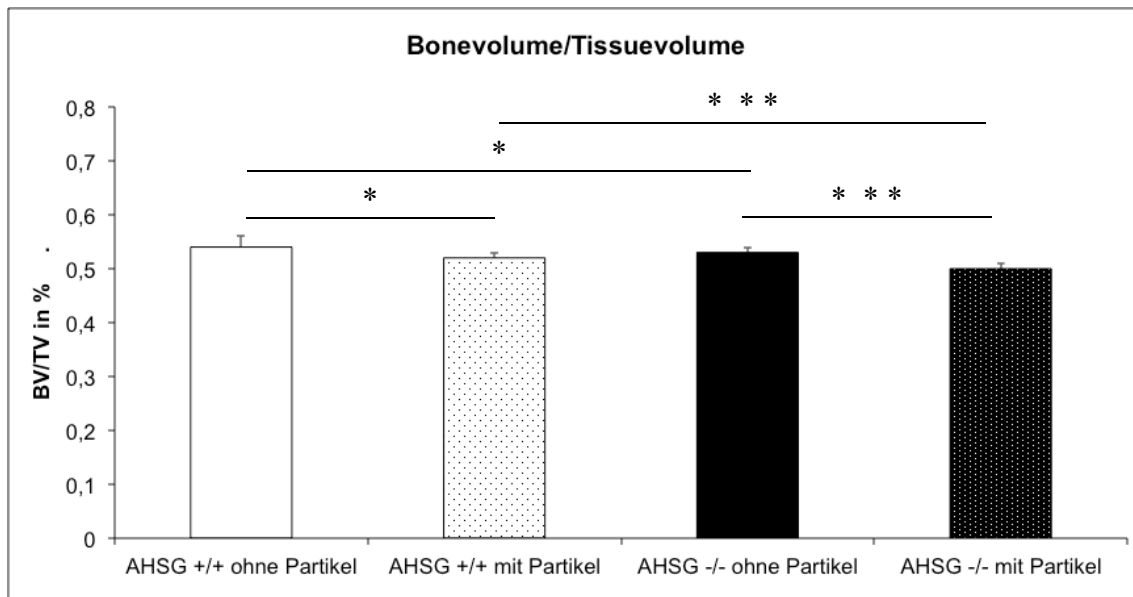


Abbildung 3: Darstellung des relativen Knochenvolumens (BV/TV) in %. Die Bestimmung erfolgte mit einem X-Ray Microtomograph vom Typ Skyscan 1072 und das Verhältnis von BV zu TV wurde anschließend mit dem CT-Analyser-Programm berechnet.

Pro Mausgruppe wurden die Mittelwerte mit der dazu gehörigen Standardabweichung angegeben.

( \*\*\* (p<0,001), \*\* (p<0,01), \* (p<0,05))

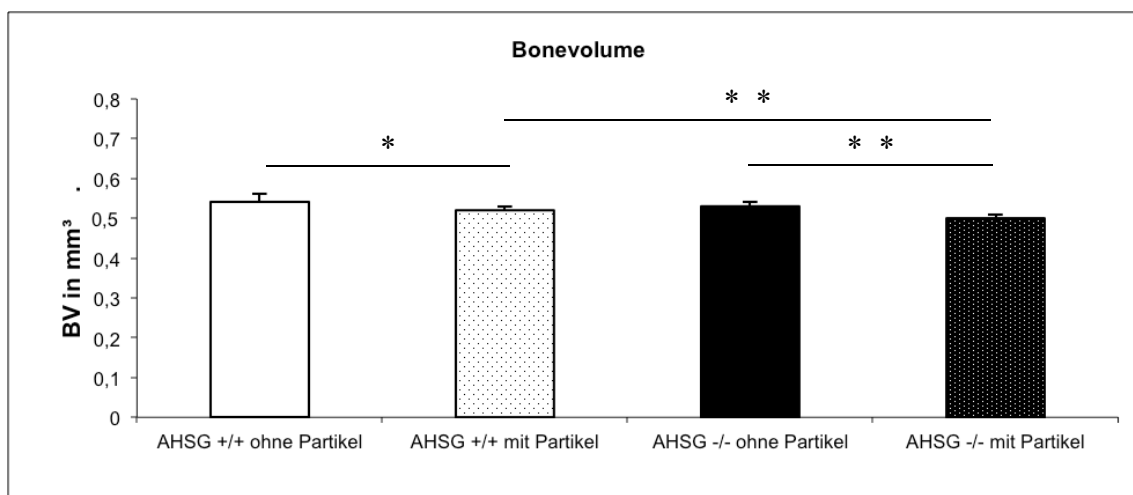


Abbildung 4: Darstellung des Knochenvolumens (BV) in mm³. Die Bestimmung erfolgte mit einem X-Ray Microtomograph vom Typ Skyscan 1072 und wurde anschließend mit dem CT-Analyser-Programm berechnet. Pro Mausgruppe wurden die Mittelwerte mit der dazu gehörigen Standardabweichung angegeben.

( \*\*\* (p<0,001), \*\* (p<0,01), \* (p<0,05))

### 3.3.2 3D-Analyse

Die 3D-Rekonstruktionen mit Hilfe des Mikro-Computertomographen zeigen die unterschiedliche Ausprägung der Osteolyse sehr deutlich. Gut zu erkennen ist, dass die Gruppen mit Partikelimplantation im Gegensatz zu denen ohne Partikelimplantation verstärkt Osteolyse haben (s. Abbildung 5-9). Bei den Mäusegruppen mit Partikelimplantation (Gruppe II und IV) befinden sich die Osteolysezonen im Bereich der Mittelliniensutur. Besonders deutlich ist das in Abbildung 10 zu sehen. Der Vergleich der beiden partikelimplantierten Gruppen zeigt, dass die Fetuin-A Knock-out-Mäuse mehr Osteolyse haben als die Wildtypmäuse. Insgesamt ist die Osteolyse bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen stärker ausgeprägt als bei den Wildtypmäusen.

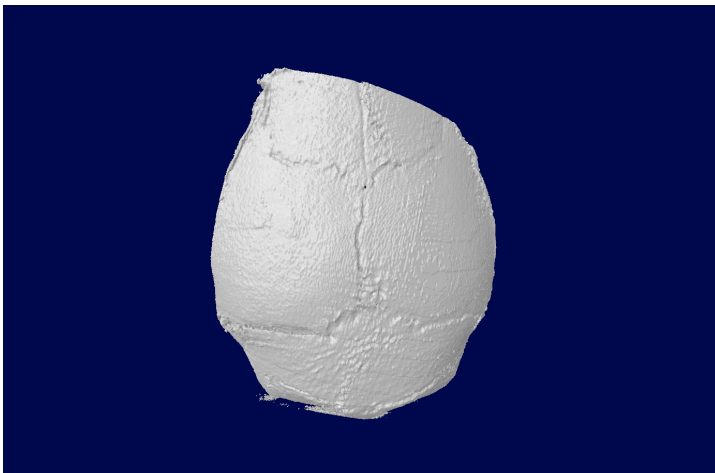


Abbildung 5: 3D-Bild einer Mäusecalvaria der Gruppe I. Aus den 2D-Schnittbildern einer Maus aus Gruppe I wurde mit einem Oberflächen- und Volumen-Renderingverfahren dieses 3D-Bild rekonstruiert. Die ROI wurde entlang der Mittelliniensutur des Mäuseschädels platziert. Die Cubes ( $2,00 \text{ mm}^3$ ) wurden von der Occipitalsutur Richtung frontal gesetzt und umfassten so ein Volumen von  $2 \times 2 \times 6 \text{ mm}^3$ .

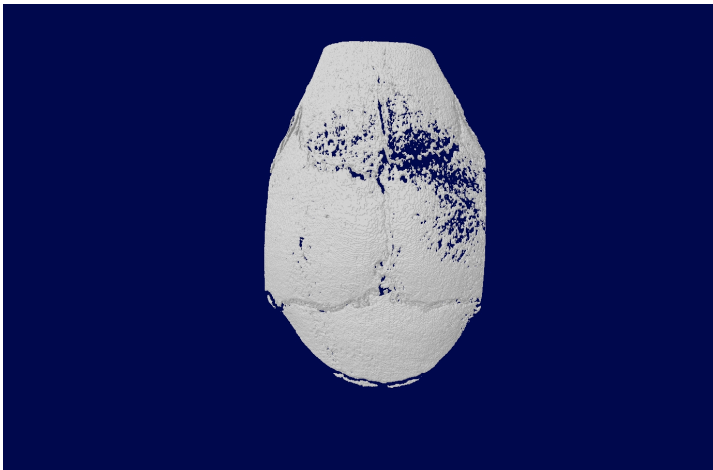


Abbildung 6: 3D-Bild einer Mäusecalvaria der Gruppe II. Aus den 2D-Schnittbildern einer Maus aus Gruppe II wurde mit einem Oberflächen- und Volumen-Renderingverfahren dieses 3D-Bild rekonstruiert. Die blauen Stellen im Bereich der Mäusecalvaria stellen die Osteolyse dar. Die ROI wurde entlang der Mittelliniensutur des Mäuseschädels platziert. Die Cubes ( $2,00 \text{ mm}^3$ ) wurden von der Occipitalsutur Richtung frontal gesetzt und umfassten so ein Volumen von  $2 \times 2 \times 6 \text{ mm}^3$ .

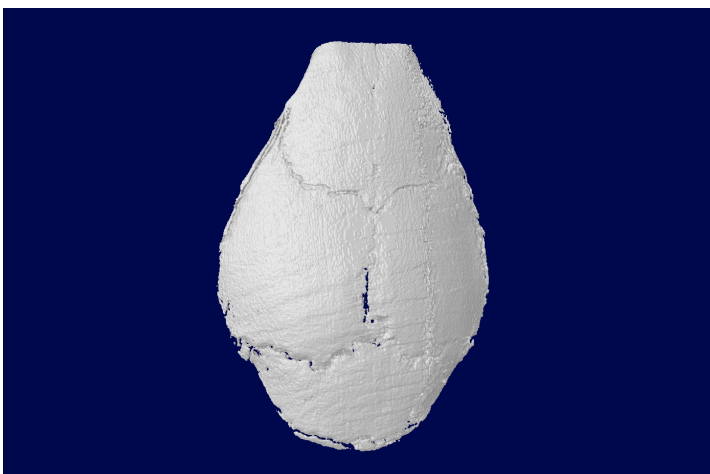
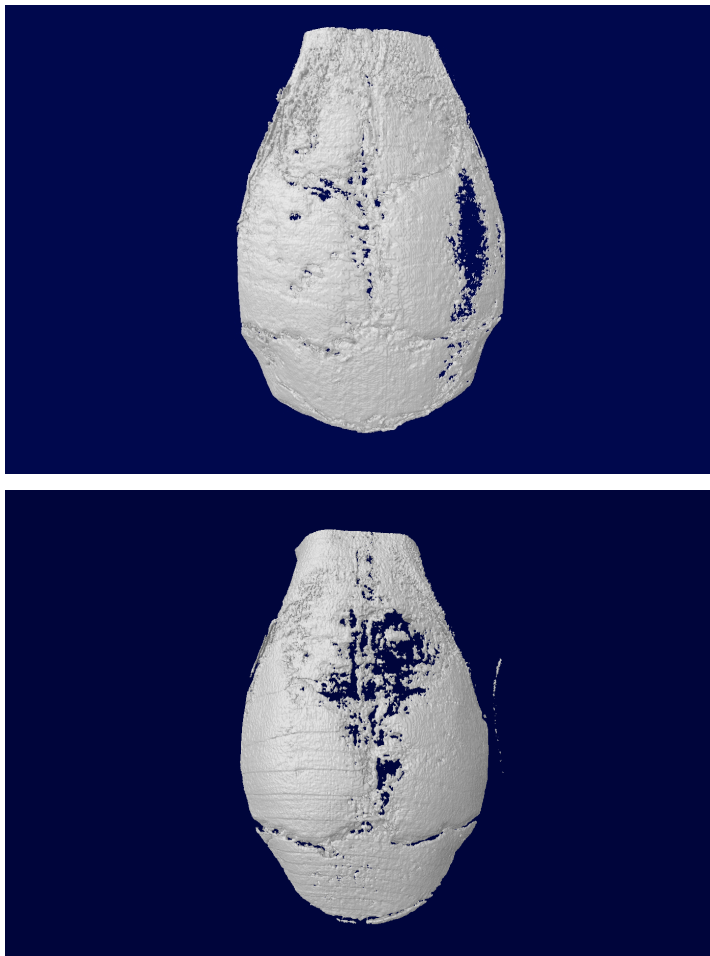


Abbildung 7: 3D-Bild einer Mäusecalvaria der Gruppe III. Aus den 2D-Schnittbildern einer Maus aus Gruppe III wurde mit einem Oberflächen- und Volumen-Renderingverfahren dieses 3D-Bild rekonstruiert. Die blauen Stellen im Bereich der Mäusecalvaria stellen die Osteolyse dar. Die ROI wurde entlang der Mittelliniensutur des Mäuseschädels platziert. Die Cubes ( $2,00 \text{ mm}^3$ ) wurden von der Occipitalsutur Richtung frontal gesetzt und umfassten so ein Volumen von  $2 \times 2 \times 6 \text{ mm}^3$ .



Abbildungen 8+9: 3D-Bilder von zwei Mäusecalvariae der Gruppe IV. Aus den 2D-Schnittbildern jeweils einer Maus aus Gruppe IV wurden mit einem Oberflächen- und Volumen-Renderingverfahren diese 3D-Bilder rekonstruiert. Die blauen Stellen im Bereich der Mäusecalvariae stellen die Osteolyse dar. Die ROI wurde entlang der Mittelliniensutur des jeweiligen Mäuseschädels platziert. Die Cubes ( $2,00 \text{ mm}^3$ ) wurden von der Occipitalsutur Richtung frontal gesetzt und umfassten so ein Volumen von  $2 \times 2 \times 6 \text{ mm}^3$ .

### 3.4 Qualitative histologische Analyse der Knochenschnitte

In den Querschnitten stellten sich die Mäusekalottenknochen sichelförmig mit einer zentralen Verdickung, der Mittelliniensutur, dar. Bei den Knochen konnte somit zwischen einer linken und einer rechten Hälfte unterschieden werden, die durch die Mittelliniensutur verbunden waren.

Da der Knochen ständigem Umbau unterliegt, waren Osteoblasten, umgeben von Matrixsubstanz, und mehrkernige Osteoklasten zu sehen.

Durch die operative Manipulation hatte sich auf dem Knochenperiost fibrinöses und granulomatöses Narbengewebe gebildet.

### 3.4.1 Gruppe I – Wildtypmäuse ohne Partikelimplantation

In den histologischen Präparaten der Gruppe I stellte sich der Knochen als eine regelmäßige Fläche dar, die mit einem intakten Periost überzogen war. Die Mittelliniensutur zeigte einen gerichteten Verlauf der Kollagenfasern und war zellreich. In wenigen Präparaten war die Mittelliniensutur vergrößert. Leichte Osteolysen waren auf beiden Seiten der Mittelliniensutur zu erkennen. Granulationsgewebe war kaum zu finden.

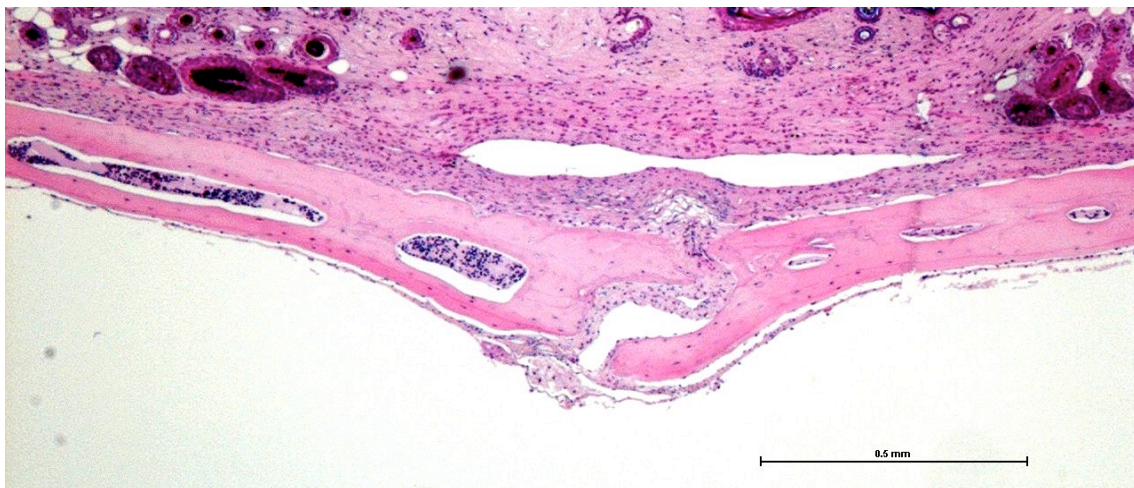


Abbildung 10: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe I. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40-fache Vergrößerung, Maßstab 0,5 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und das Periost darüber.

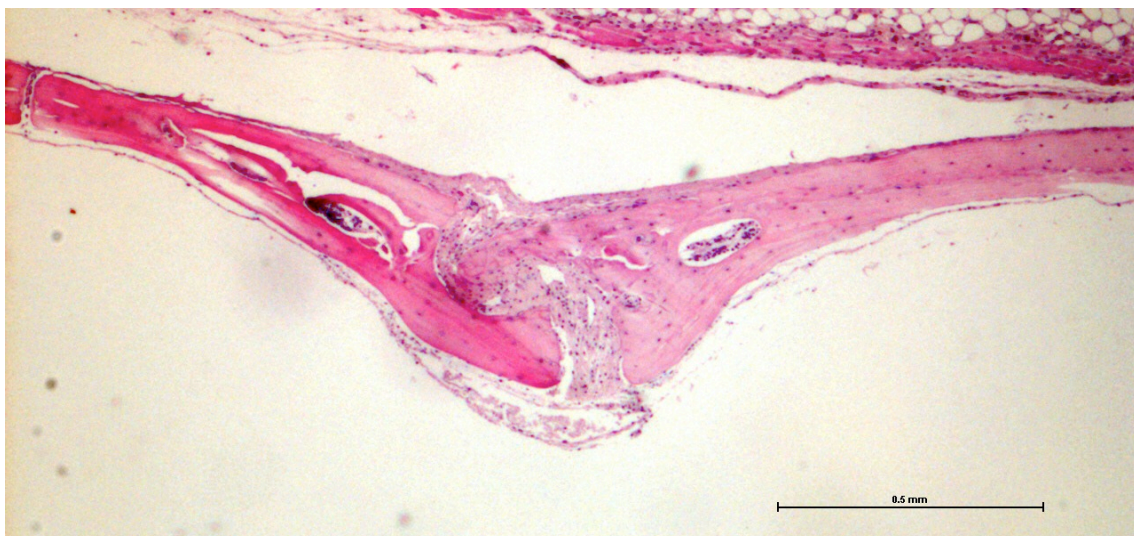


Abbildung 11: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe I. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40-fache Vergrößerung, Maßstab 0,5 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und das Periost darüber.



### 3.4.2 Gruppe II – Wildtypmäuse mit Partikelimplantation

Die Präparate der Wildtypmäuse mit Partikelimplantation zeigten ein unruhiges Bild mit großem ausgeprägtem Substanzverlust. Neben der Mittelliniensutur waren große Osteolysen sichtbar. Der Knochen war durch Bindegewebe ersetzt. Die Mittelliniensutur stellt sich vergrößert dar. Bei einigen Präparaten war der Knochen eingebrochen. Das Narbengewebe war deutlich ausgeprägter als bei Gruppe I und entzündlich infiltriert.

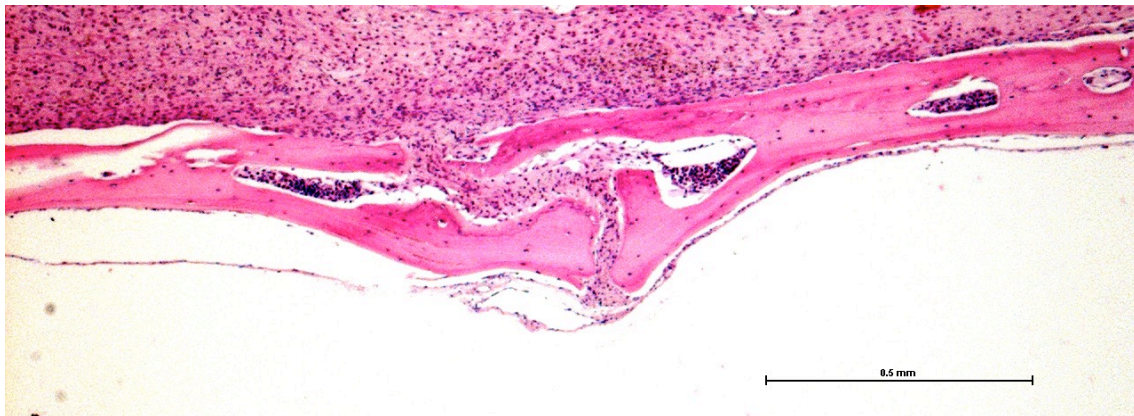


Abbildung 12: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe II. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40-fache Vergrößerung, Maßstab 0,5 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und das Periost darüber.

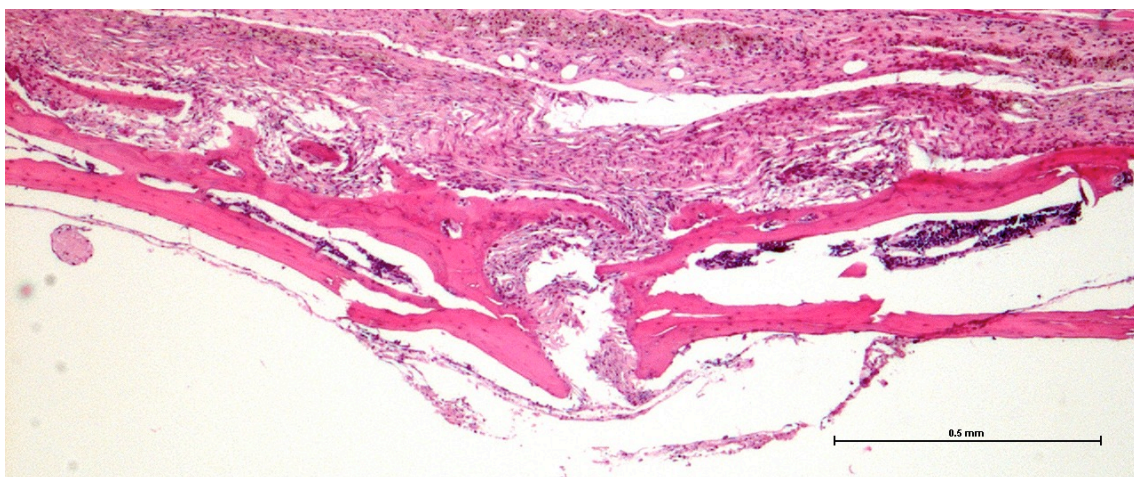


Abbildung 13: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe II. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40-fache Vergrößerung, Maßstab 0,5 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und das Periost darüber.

### 3.4.3 Gruppe III – Fetuin-A Knock-out-Mäuse ohne Partikelimplantation

Die histologischen Präparate der Gruppe III stellten sich ähnlich dar wie die der Gruppe I. Der Knochen erschien als weitgehend regelmäßige Fläche, überzogen mit intaktem Periost. In manchen Präparaten war die Mittelliniensutur vergrößert. Auf beiden Seiten der Mittelliniensutur waren Osteolysen erkennbar.

Granulationsgewebe war leicht ausgebildet und nicht entzündlich infiltriert.

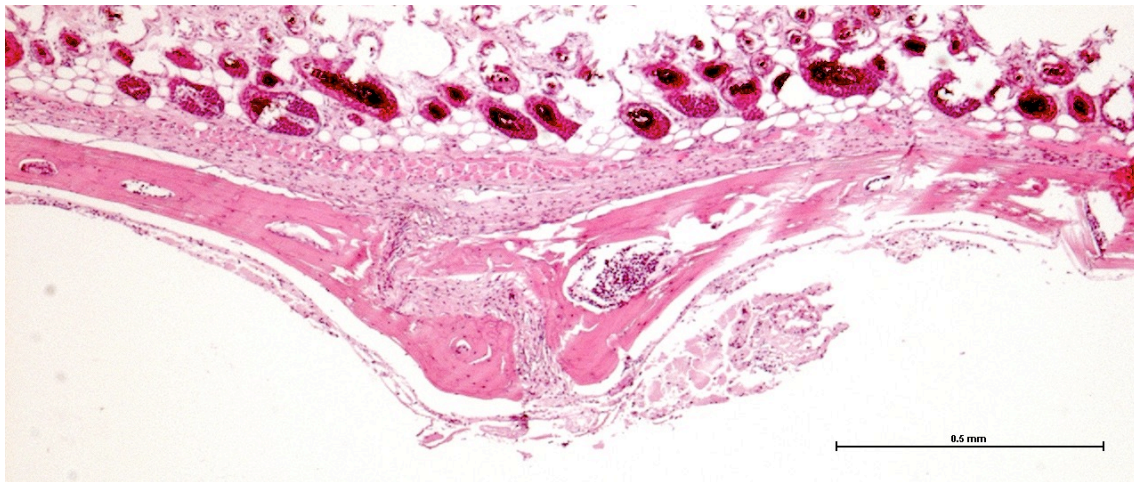


Abbildung 14: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe III. Hämatoxylin-Eosin-Färbung ,40-fache Vergrößerung, Maßstab 0,5 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und das Periost darüber.



Abbildung 15: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe III. Hämatoxylin-Eosin-Färbung ,40-fache Vergrößerung, Maßstab 0,5 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und das Periost darüber.



#### 3.4.4 Gruppe IV - Fetuin-A Knock-out-Mäuse mit Partikelimplantation

In den Präparaten der Gruppe IV war die Knochenoberfläche sehr unregelmäßig und das Periost nicht mehr intakt. Die Mittelliniensutur war, wie auch bei Gruppe II, vergrößert. Der Knochen zeigte einen starken Substanzverlust und war durch Bindegewebe ersetzt. Seitlich der Mittelliniensutur befanden sich große Osteolysezonen. Zum Teil war der Knochen mehrfach perforiert und stark aufgelockert.

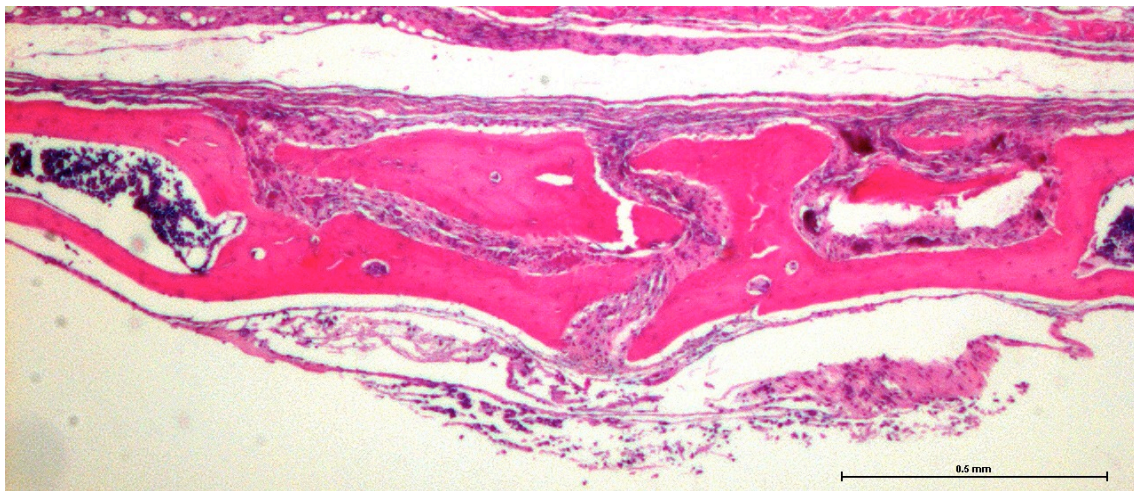


Abbildung 16: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe IV. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40-fache Vergrößerung, Maßstab 0,5 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und das Periost darüber.

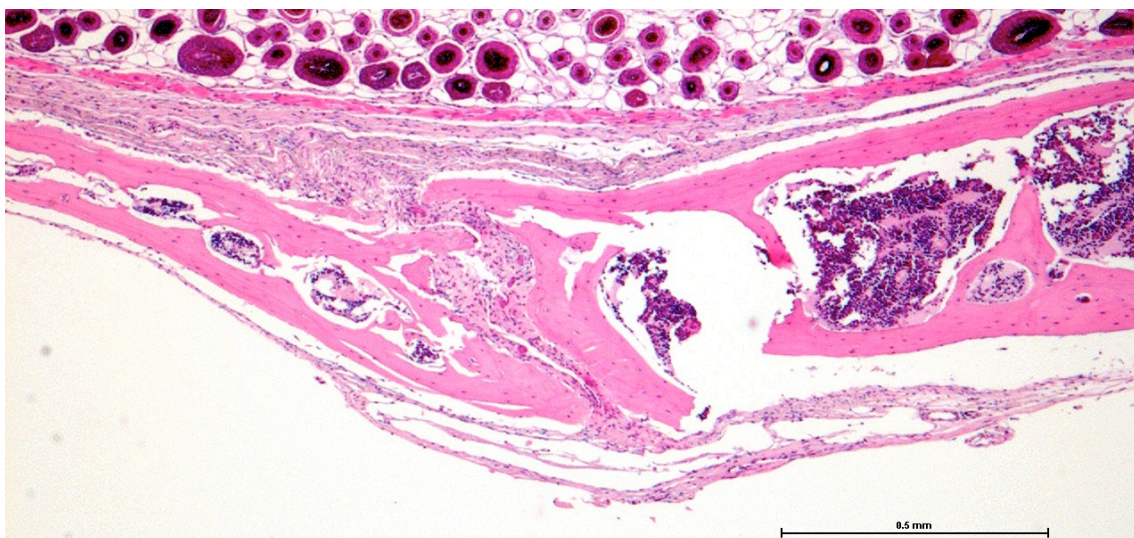


Abbildung 17: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe II. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40-fache Vergrößerung, Maßstab 0,5 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und das Periost darüber.

### 3.5 Quantitative histologische Analyse der Mittelliniensutur

Der ANOVA-Test zur Osteolysezone im Bereich der Mittelliniensutur, im Weiteren auch Mittelliniensuturfläche genannt, zeigte einen signifikanten Einfluss der Partikel ( $p \leq 0,0001$ ), der Gruppe ( $p \leq 0,0001$ ) und der Kombination von Partikeln und Gruppe ( $p \leq 0,05$ ).

Gruppe I hatte eine Mittelliniensuturfläche von  $0,06 \text{ mm}^2$  (Standardabweichung (SD):  $0,02 \text{ mm}^2$ ) (s. Abb. 18), bei Gruppe II betrug sie  $0,14 \text{ mm}^2$  (SD:  $0,06 \text{ mm}^2$ ) (s. Abb. 19), bei Gruppe III  $0,11 \text{ mm}^2$  (SD:  $0,08 \text{ mm}^2$ ) (s. Abb. 20), und Gruppe IV hatte eine Mittelliniensuturfläche von  $0,32 \text{ mm}^2$  (SD:  $0,14 \text{ mm}^2$ ) (s. Abb. 21).



Abbildung 18: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe I. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100-fache Vergrößerung, Maßstab 0,1 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und grün umrandet. Das Periost liegt darüber.



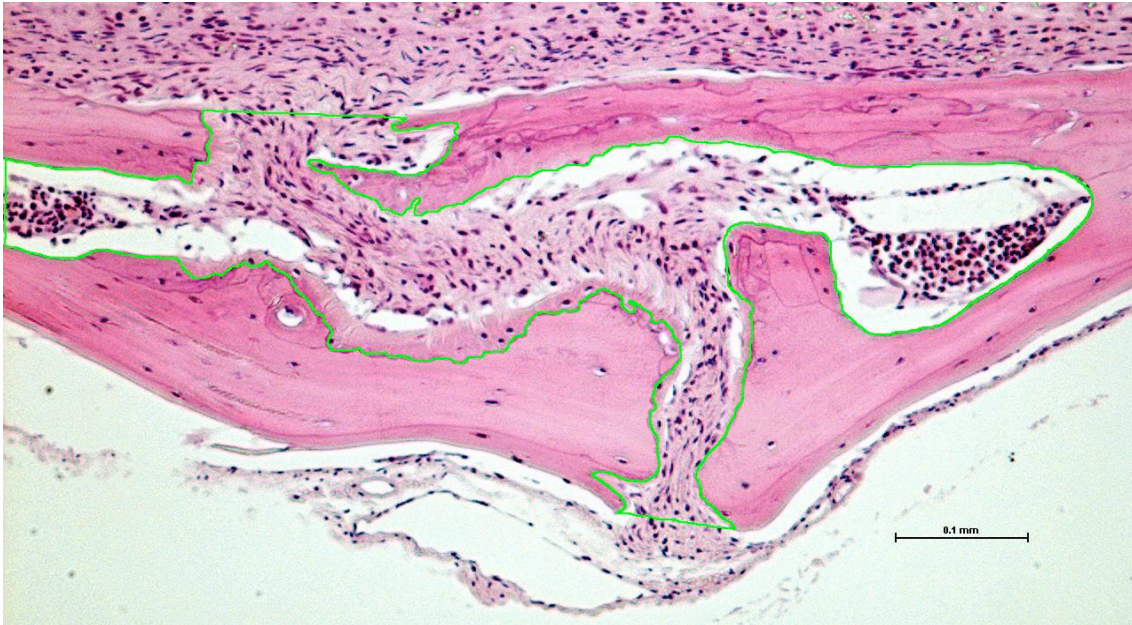


Abbildung 19: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe II. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100-fache Vergrößerung, Maßstab 0,1 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und grün umrandet. Das Periost liegt darüber.

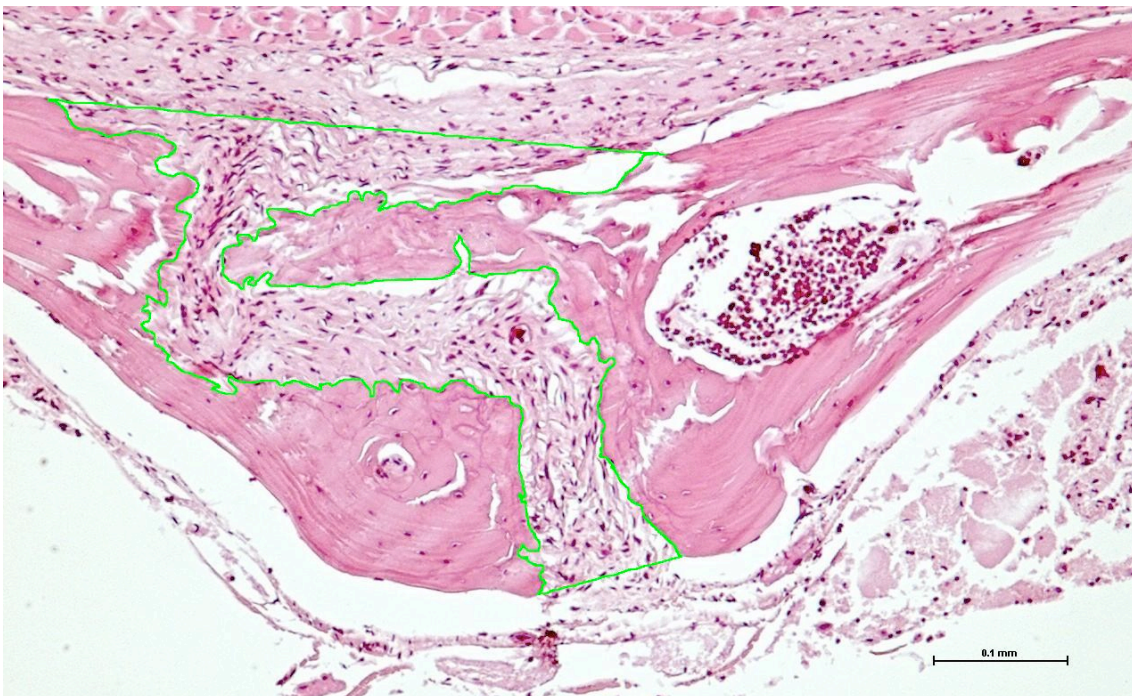


Abbildung 20: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe III. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100-fache Vergrößerung, Maßstab 0,1 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und grün umrandet. Das Periost liegt darüber.



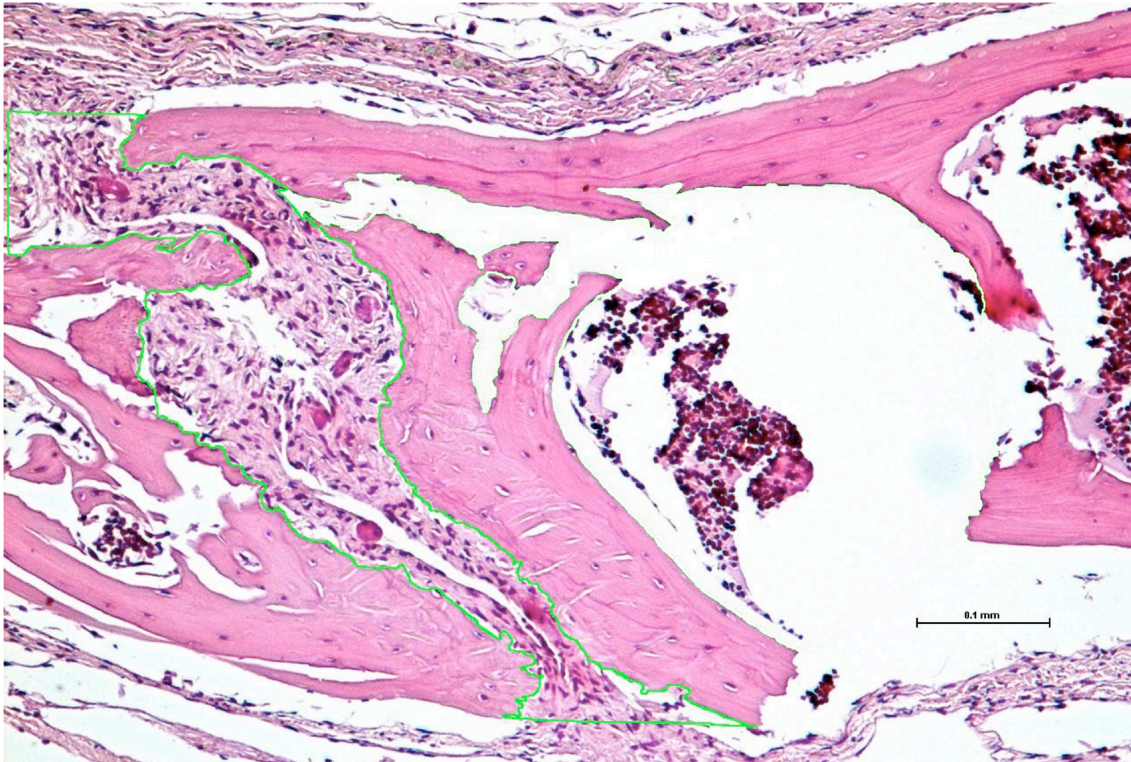


Abbildung 21: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe IV. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 100-fache Vergrößerung, Maßstab 0,1 mm. Die Mittelliniensutur ist in der Mitte des Bildes zu sehen und grün umrandet. Das Periost liegt darüber.

Die Wildtypmäuse mit Partikelimplantation zeigten eine signifikant größere Osteolysezone als die Wildtypmäuse ohne Partikelimplantation ( $p \leq 0,05$ ). Auch die Fetuin-A Knock-out-Mäuse mit Partikelimplantation wiesen eine signifikant größere Osteolysezone auf als die Mäuse ohne Partikelimplantation ( $p \leq 0,001$ ).

Beim Vergleich der beiden Mausgruppen ohne Partikelimplantation (Gruppe I und III) hatten die Fetuin-A Knock-out-Mäuse mehr Osteolyse als die Wildtypmäuse. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,19$ ). Bei dem Vergleich der beiden Mausgruppen mit Partikelimplantation (Gruppe II und IV) hatten die Fetuin-A Knock-out-Mäuse signifikant mehr Osteolyse als die Wildtypmäuse ( $p \leq 0,0001$ ).

Der Vergleich der beiden Mausgruppen Wildtyp und Fetuin-A Knock-out zeigte: Die Osteolysefläche ist bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen - sowohl bei denen mit Partikelimplantation als auch bei denen ohne Partikelimplantation - jeweils größer als bei den Wildtypmäusen (s. Anhang 7.5, Tabelle 3).

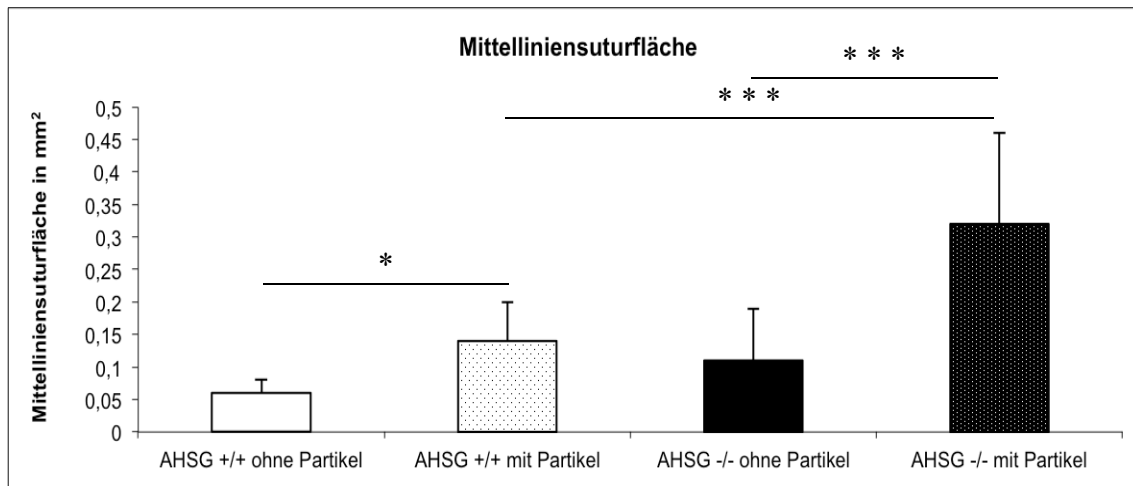


Abbildung 22: Die Mittelliniensuturfläche wurde analysiert, indem die HE-gefärbten histologischen Schnitte unter einem Lichtmikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert und dann mit dem Programm NIS Elements AR 3.0 ausgewertet wurden. Pro Mausgruppe wurden die Mittelwerte mit der dazu gehörigen Standardabweichung angegeben.

( \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ))

### 3.6 Osteoklastenanzahl in der TRAP-Färbung

Die durch TRAP-Färbung rötlichen Osteoklasten befanden sich am Rand der Osteolysezonen, in der Mittelliniensutur und im Granulationsgewebe.

Der ANOVA-Test im Bezug auf die TRAP-positiven Zellen zeigte ausschließlich einen signifikanten Einfluss der Partikel ( $p \leq 0,05$ ). Hinsichtlich der Gruppe ( $p = 0,3$ ) und der Kombination von Partikeln und Gruppe ( $p = 0,8$ ) ergab sich keine Signifikanz.

In Gruppe I wurde ein Durchschnitt von 9,67 TRAP-positiven Zellen pro Gesichtsfeld gezählt (SD: 5,26). In Gruppe II konnten durchschnittlich 15,54 TRAP-positive Zellen gezählt werden (SD: 8,34). Bei den Mäusen dieser Gruppe gab es große Unterschiede bei der Anzahl der TRAP-positiven Zellen: Sie lag zwischen minimal 6 und maximal 27 TRAP-positiven Zellen. In Gruppe III betrug die durchschnittliche Anzahl der TRAP-positiven Zellen 6,39 (SD: 1,47). In Gruppe IV lag der Durchschnitt der TRAP-positiven Zellen bei 13,46 (SD: 5,32) (s. Anhang 7.5, Tabelle 4).

Sowohl bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen als auch bei den Wildtypmäusen mit Partikelimplantation war die Zahl der Osteoklasten - im Vergleich zu den Mäusen ohne Partikelimplantation – höher.

Zwischen den Wildtypmäusen und den Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit Partikelimplantation konnte ebenfalls kein Unterschied festgestellt werden. Es zeigten sich besonders bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen vermehrt TRAP-positive Zellen im Granulationsgewebe.

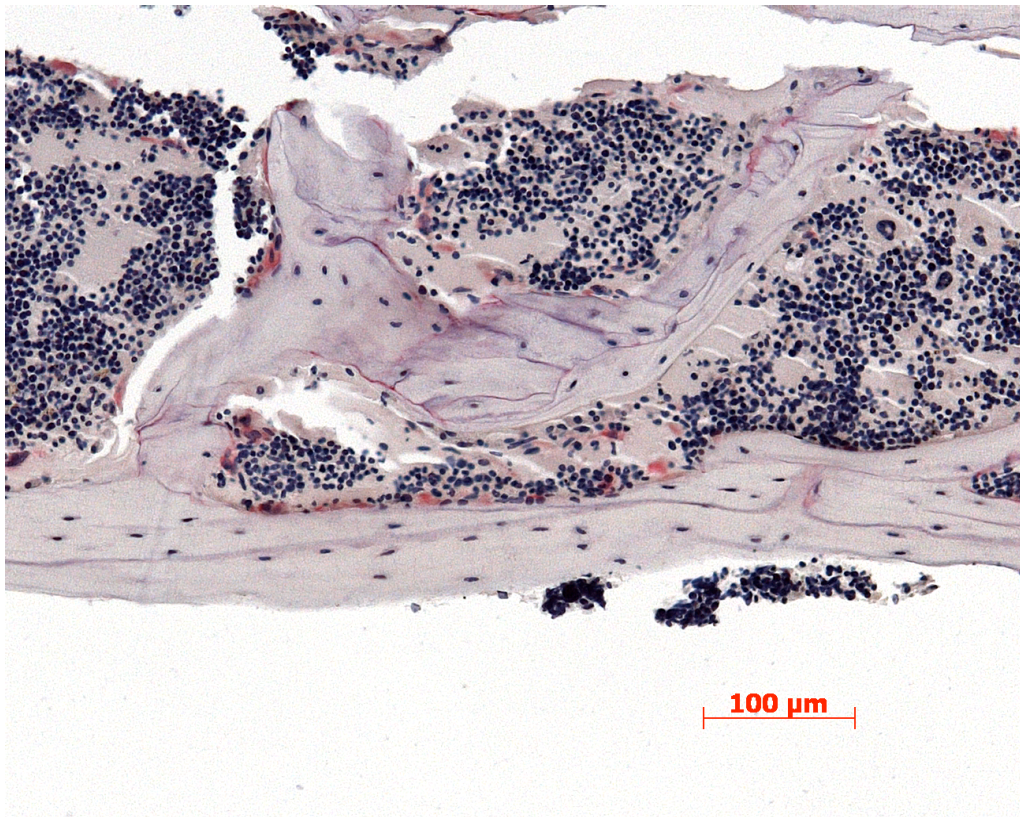


Abbildung 23: Histologisches Präparat einer Mäusecalvaria der Gruppe IV. TRAP-Färbung, 200-fache Vergrößerung. Durch die Färbung stellen sich die Osteoklasten rot dar.

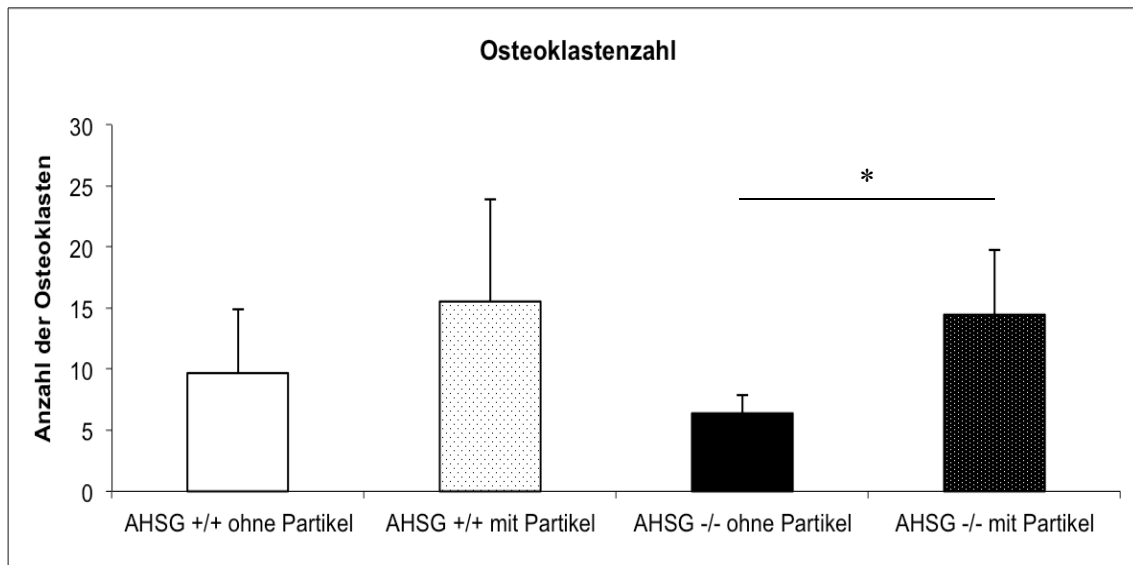


Abbildung 24: Die Osteoklastenzahl pro Gesichtsfeld wurde anhand der TRAP eingefärbten histologischen Schnitte bei einer 200-fachen Vergrößerung ausgezählt. Je Mausgruppe wurden die Mittelwerte mit der dazu gehörigen Standardabweichung angegeben.

( \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ))

## 4 Diskussion

### 4.1 Versuchsmodell

Die meisten implantierten Hüftendoprothesen bestehen heutzutage aus einem Metall- oder Keramikhüftgelenkshkopf und einer Hüftgelenkspfanne aus ultrahochmolekulargewichtigem Polyethylen (UHMWPE) (Ingham and Fisher 2000). Als Hauptursache für die aseptische Lockerung solcher Endoprothesen gilt nach heutigem wissenschaftlichen Verständnis die partikelinduzierte Osteolyse (Drees and Huber 2004). Dieser Prozess wird maßgeblich durch Polyethylen-Abriebpartikel hervorgerufen (Affatato et al. 2005, Atienza and Maloney 2008). Wegen der klinischen Bedeutung wurden deswegen für das Osteolysemodell der vorliegenden Studie standardisierte Polyethylenpartikel verwendet. Diese führen außerdem im Gegensatz zu Metallpartikeln nicht zu Artefakten im Mikro-CT. Größe und Größenverteilung der Partikel orientierten sich an mehreren übereinstimmenden Forschungsergebnissen, die unter anderem durch Gewebeuntersuchungen nach Revisionsoperationen gewonnen wurden (Benz et al. 2001, Mabrey et al. 2002, von Knoch et al. 2004). Die verwendeten Ceridust® - Polyethylenpartikel sind nach einer Untersuchung von von Knoch et al. für In-vitro- und In-vivo-Experimente geeignet (von Knoch et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde das Mausmodell zur partikelinduzierten Osteolyse – notwendige Voraussetzung für diese Studie – erneut bestätigt.

Bei dem angewendeten Mausmodell gibt es auch Beschränkungen. Die Untersuchungen zur partikelinduzierten Osteolyse wurden aus praktischen Gründen (Größe) an der Schädelkalotte, einem desmoiden Knochen, und nicht am Hüftknochen, einem Lamellenknochen, durchgeführt. Diese Knochen werden unterschiedlich beansprucht. Darüber hinaus wurden den Versuchstieren die Partikel an einem Tag und in großer Menge implantiert. Das Ausmaß der entstandenen Osteolyse wurde schon nach 14 Tagen betrachtet. Beim Menschen dagegen ist die aseptische Hüftprothesenlockerung ein jahrelanger Prozess. Die Partikel entstehen durch kontinuierliche Druck-, Scher- und Reibkräfte. Zudem sind die Hüftknochen der Patienten, die eine Endoprothese bekommen, meist arthrotisch verändert.

Eine weitere Beschränkung betrifft das Verhalten der implantierten Partikel. Studien haben gezeigt, dass die Mittelliniensutur geeignet ist, um das Ausmaß partikelinduzierter Osteolyse zu messen (Li et al. 2014, Wedemeyer et al. 2007). Die 3D-Rekonstruktionen zeigen, dass die Osteolyse nicht nur wie erwartet an der Mittelli-



niensutur besonders stark ausgeprägt, sondern auch lateral und frontal vorhanden war. Diese lateralen Osteolysen lassen sich nicht durch die Operation erklären, denn diese wurde standardisiert zusammen mit erfahrenen Operateuren durchgeführt. Das Phänomen ist aus anderen Studien, die sich mit partikelinduzierter Osteolyse beschäftigen, bekannt und könnte durch „wandernde Partikel“ bedingt sein. Die 3D-Rekonstruktionen dieser Studien zeigen ebenfalls laterale Osteolysen im Bereich der Mäusecalvariae (Landgraeber et al. 2014, Li et al. 2014, Rao et al. 2013).

Dies alles muss bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Dennoch ist das Calvaria Modell das am meisten genutzte, anerkannte und publizierte Tiermodell für die Untersuchung der aseptischen Prothesenlockerung.

## 4.2 Phänotypen der Wildtypmäuse und Fetuin-A Knock-out-Mäuse

Das wissenschaftliche Arbeiten mit Fetuin-A Knock-out-Mäusen ist mittlerweile etabliert. So haben bereits 1997 Jahnen-Dechent et al. Mäuse gentechnisch manipuliert, um die Auswirkungen eines Fetuin-A Knock-outs auf die Calcifizierung zu untersuchen (Jahnen-Dechent et al. 1997). Weitere Studien folgten. Schäfer et al. zum Beispiel wiesen nach, dass Fetuin-A ein wichtiger systemischer Hemmstoff der ektopen Calcifizierung ist (Schäfer et al. 2003). Laut Schäfer et al. sind Fetuin-A Knock-out-Mäuse mit B6 Hintergrund geeigneter, um die Rolle von Fetuin-A in Bezug auf die Knochenstruktur zu untersuchen als Fetuin-A Knock-out-Mäuse mit einem DBA/2 Hintergrund. Als Grund wird genannt, dass sich durch den Calcifizierungsphänotyp und die renale Osteodystrophie bei DBA/2 Hintergrund Bedingungen ergeben, die einen Vergleich mit der Kontrollgruppe erschweren (Schäfer 2003).

Die vorliegende Studie zeigt bisher nicht bekannte Unterschiede zwischen dem Phänotyp der Wildtypmäuse C57BL/6 und dem der Fetuin-A Knock-out-Mäuse B6-(HRG33)tm. Diese Unterschiede betreffen die Serumparameter und die Knochenstruktur. Der Phänotyp der Fetuin-A Knock-out-Maus mit B6 Hintergrund weist signifikant niedrigere Serumwerte von Calcium und alkalischer Phosphatase und signifikant erhöhte Serumwerte von OPG auf. Das BV/TV ist im Vergleich zum Wildtyp bei der Fetuin-A Knock-out-Maus signifikant niedriger. Rein äußerlich ist der Phänotyp im Vergleich zu dem der Wildtypmaus unauffällig.

Die im Serum gemessenen Calciumwerte der Wildtypmäuse entsprachen präoperativ dem Referenzbereich von 1,88 – 2,33 mmol/l für C57BL/6 Mäuse (Boehm et al. 2007), die der Fetuin-A Knock-out-Mäuse lagen darunter. Auch die Phosphatkonzentration im Serum war im Vergleich vermindert, jedoch nicht signifikant. Insgesamt lagen die

Phosphatwerte der Wildtypmäuse und der Fetuin-A Knock-out-Mäuse präoperativ über dem Normwert von humanem Serumphosphat (Referenzbereich 2,6 – 4,5 mg/dl) (Gressner and Arndt 2013).

Die Calcium- und Phosphatwerte entsprechen nicht den Erwartungen. Zu erwarten gewesen wäre eine Erhöhung der Calcium- und Phosphatwerte, denn durch das fehlende Fetuin-A können Calcium und Phosphat im Blut nicht mehr gepuffert und stabilisiert werden (Schäfer 2003). Eine Erklärung für die verminderten Serumkonzentrationen von Calcium und Phosphat könnte eine ektope Calcifizierung sein, wie sie bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit DBA/2 Hintergrund bekannt ist. Diese Erklärung würde durch den signifikant erhöhten OPG-Wert unterstützt. Studien haben gezeigt, dass bei ektope Calcifizierung vermehrt OPG freigesetzt wird (Messa et al. 2007, Shroff et al. 2008). Dagegen spricht jedoch eine Studie von Herrmann, nach der Fetuin-A Knock-out-Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund nicht spontan calcifizieren (Herrmann 2012). Das zeigte auch schon eine Arbeit von Schäfer et al. (Schäfer et al. 2003). Dort wurden außerdem keine signifikanten Unterschiede der Calcium- und Phosphatwerte im Serum bei Wildtyp- und bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit B6 Hintergrund festgestellt.

Die im Serum gemessene alkalische Phosphatase war bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen signifikant niedriger als bei den Wildtypmäusen. Damit unterscheiden sie sich deutlich von den Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit DBA/2 Hintergrund. Bei diesen Mäusen stellten Schäfer et al. einen signifikant erhöhten AP-Wert fest und deuteten dies als Hinweis auf eine pathologisch veränderte Osteoblastenaktivität (Schäfer et al. 2003). Da erhöhte AP-Werte auf eine verstärkte Osteoblastenaktivität hinweisen (Swaminathan 2001), könnte der niedrigere Wert der alkalischen Phosphatase in Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit einer verminderten Funktion der Mineralisation durch Osteoblasten korrelieren. Dazu würden auch die tendenziell niedrigeren Osteocalcin-Serumwerte der Fetuin-A Knock-out-Mäuse im Vergleich zu denen der Wildtypmäuse passen, denn Osteocalcin ist ein Marker für die Knochenneubildung mit vermehrter Osteoblastenaktivität (Swaminathan 2001). Der niedrigere Osteocalcin-Serumwert könnte demnach für eine verminderte Osteoblastenaktivität sprechen.

Dem entsprechen die signifikant niedrigeren Werte von BV/TV bei den scheinoperierten Fetuin-A Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den scheinoperierten Wildtypmäusen. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Phänotyp der Fetuin-A Knock-out-Maus eine verminderte Knochenmineralisierung aufweist – unabhängig von der Partikelimplantation. Gegen diese Annahme sprechen die Ergebnisse der Arbeit von Schäfer et al. (Schäfer et al. 2003). Dort wurden beim Phänotyp der Fetuin-A Knock-out-Maus mit

B6 Hintergrund keine Auffälligkeiten der Knochenstruktur festgestellt. Da die Werte für BV/TV in der vorliegenden Arbeit nach der Scheinoperation gemessen wurden, könnte eine postoperative milde Form der Osteolyse (Wedemeyer et al. 2007) in Kombination mit dem fehlenden Fetuin-A Ursache für das verminderte BV/TV sein. Dieser Zusammenhang wird im Kapitel 4.4. ausführlicher diskutiert.

Bei den übrigen Laborparametern waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die RANKL-Serumwerte waren im Vergleich nur minimal erhöht. Auch die OPG/RANKL-Serumwerte zeigten keinen signifikanten Unterschied. Sie waren tendenziell bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen höher als bei den Wildtypmäusen. Da OPG und RANKL kompetitiv an den RANK-Rezeptor binden, könnte der im Vergleich zu RANKL deutlich stärker gestiegene OPG-Serumwert für eine verminderte Knochenresorption beziehungsweise eine erhöhte Knochenmineraldichte sprechen.

Auch bei den Werten für DPD/Kreatinin im Urin als Marker für die Knochenresorptionsrate konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Fetuin-A Knock-out-Mäusen und Wildtypmäusen nachgewiesen werden. Im Vergleich waren die DPD/Kreatinin Werte bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen geringer. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen ein verminderter Knochenabbau stattfindet. Dagegen aber sprechen einmal mehr die Werte von BV/TV.

Im Folgenden werden die Serumwerte im prä- und postoperativen Vergleich diskutiert. Von besonderem Interesse dabei ist, wie sich partikelinduzierte Osteolyse auf die Serumparameter auswirkt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es postoperativ zu einer Entzündungsreaktion (Rao et al. 2013) und damit – wie erwähnt - zu einer leichter Osteolyse kommen kann.

Bei allen vier Gruppen stiegen die Serumwerte für Calcium und Phosphat postoperativ signifikant an, die Werte für die alkalische Phosphatase sanken bei allen vier Gruppen. Nur bei den Wildtypmäusen mit Partikelimplantation war dieser Abfall nicht signifikant. Auch Chiu et al. wiesen einen niedrigeren Wert der alkalischen Phosphatase nach Implantation von UHMWPE-Partikeln nach (Chiu et al. 2009).

Die Veränderung der signifikanten Werte korreliert nicht mit dem Ausmaß der partikelinduzierten Osteolyse. Das Gleiche gilt auch für die übrigen Laborparameter. Sie lassen ebenfalls keine Rückschlüsse auf das Ausmaß der partikelinduzierten Osteolyse zu. Betrachtet man ausschließlich die postoperativen Laborwerte der Wildtyp- und der Fetuin-A Knock-out-Mäuse nach Partikelimplantation, ergeben sich zwei signifikante Werte. Die alkalische Phosphatase und DPD/Kreatinin sanken bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen. Die Werte der AP können mit dem jeweiligen Osteolysegrad in Einklang

gebracht werden. Die Werte von DPD/Kreatinin als Parameter für Osteolyse (Lettner 2001) dagegen lassen ein gegenteiliges Osteolysebild vermuten. Zwar stiegen die DPD/Kreatininwerte nach Partikelimplantation bei beiden Mausgruppen an, jedoch wurde bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen ein geringerer Wert gemessen, obwohl eine vermehrte Osteolyse nachgewiesen wurde. Der von unserer Arbeitsgruppe in der Wildtyp-Maus als Marker für die Partikelkrankheit beschriebene Laborparameter DPD/Kreatinin konnte in der Fetuin-A Knock-out-Maus nicht bestätigt werden. Jedoch zeigt eine aktuelle, bisher nur als Vortrag publizierte Studie, dass im Menschen eine Korrelation von DPD und der Partikelkrankheit bestehen kann (Warwas et al. 2013). Die Forschergruppe um Dr. Sebastian Warwas des Uniklinikums Essen, Klinik für Orthopädie, wurde hierfür auf dem deutschen Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie im Oktober 2013 mit dem EBM Preis für evidenzbasierte Medizin ausgezeichnet.

### 4.3 Mikro-Computertomographie und Histomorphometrie

In dieser Arbeit wurden konventionelle histologische Präparate und Analyseverfahren mit dem Mikro-CT verwendet. Da der „interaction effect“ der Parameter BV und BV/TV nicht  $< 0,05$  war, sind die Aussagen der Mikro-CT Untersuchung nur deskriptiv zu betrachten. Die Unterschiede im Vergleich zu den histomorphometrischen Untersuchungen lassen sich dadurch erklären, dass bei diesem Verfahren nur jeweils vier Schnitte der Mittellinie gemittelt wurden im Vergleich zum Mikro-CT, bei dem ein Bereich von  $2 \times 2 \times 6 \text{ mm}^3$  gescannt wurde. Die Kombination dieser beiden Verfahren erwies sich zusammen mit der 3D-Rekonstruktion als sehr hilfreich, da erst die mit dem Mikro-CT erstellten 3D-Bilder das ganze Ausmaß der partikelinduzierten Osteolyse sichtbar machten.

Die Histomorphometrie gilt bislang als Goldstandard zur quantitativen Untersuchung von Knochen (Parfitt et al. 1987). Sie liefert in der vorliegenden Arbeit wichtige Informationen und aussagekräftige Ergebnisse über Osteoblasten und Osteoklasten, Weichteilgewebe, Knochenstruktur sowie über das Ausmaß der Osteolyse. Beide Methoden ergaben nahezu einheitliche Ergebnisse im Bezug auf die gemessene Osteolyse. Auch andere Studien, die sich explizit mit dem Vergleich von Histomorphometrie und Mikro-Computertomographie befassen, stellten bei der Analyse von Knochenstrukturen Korrelationen zwischen beiden Methoden fest (David et al. 2003).

In dieser Studie wurden die Mäuseschädel zunächst präpariert, im Mikro-CT gescannt und dann das BV und BV/TV in einer festgelegten „Region of Interest“ gemessen. Als „Region of Interest“ wurde die Mittelliniensutur gewählt, die bereits in vorausgegangen-

nen Studien als geeignet beschrieben wurde (Wedemeyer et al. 2007). Um einen größeren Bereich der Suturfläche vermessen zu können, wurde das in anderen Studien übliche VOI von  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$  (Jaeckel 2010, Landgraeber et al. 2009) auf  $2 \times 2 \times 6 \text{ mm}^3$  im Bereich der Mittelliniensutur vergrößert. Die Ausdehnung des VOI-Bereichs erfolgte von occipital nach frontal, weil in diesem Bereich die Calvaria fast eben und standardisiert lokalisierbar ist. Auf eine Ausdehnung des VOI-Bereichs nach lateral wurde bewusst verzichtet, da die Calvaria im Seitenbereich nicht mehr nahezu plan ist, sondern zunehmend gewölbt. Eine Messung in diesem Bereich würde die Vergleichbarkeit der Werte aus unserer Sicht nicht mehr sicher gewährleisten und die Ergebnisse möglicherweise verzerren.

Anschließend wurden von den präparierten Mäuseschädeln histologische Schnitte angefertigt. Zum Schluss wurden von Mäusen aller vier Versuchsgruppen 3D-Bilder des gesamten Schädels mit Hilfe der zuvor gewonnenen Daten rekonstruiert. Sie zeigten, wie bereits dargelegt, dass auch im lateralen Bereich der Mäusecalvariae Osteolysen vorhanden waren. Das auf den 3D-Bildern erkennbare Ausmaß der Knochenresorption bei den Versuchstieren der Gruppen I bis IV entsprach aber in der Verhältnismäßigkeit den jeweils gemessenen Werten. Das heißt, bei den Fetuin-A Knock-out Mäusen ist auch auf den 3D-Bildern am meisten Osteolyse sichtbar (s. Ergebnisse 3.3.2, Abb. 5-9).

Um einen Überblick über die Osteolysezonen zu gewinnen, empfiehlt es sich für weitere Studien, direkt 3D-Bilder anzufertigen. Insgesamt hat sich gezeigt, dass die Mikro-CT-Analyse als wichtige Ergänzung zur histologischen Auswertung notwendig ist, um das tatsächliche Ausmaß der Osteolyse zu bestimmen (Wedemeyer et al. 2007).

Die Vorteile der Mikro-CT-Analyse haben bereits Feldkamp et al. bei der Einführung dieser Methode zur Knochenuntersuchung 1989 dargelegt. Dazu gehört insbesondere die zwei- und dreidimensionale Strukturanalyse ohne Zerstörung der Probe (Feldkamp et al. 1989). In den letzten Jahren haben sich die Möglichkeiten der rechnergesteuerten Mikro-CT-Analyse weiter verbessert, so dass mit Hilfe der extrem hohen Auflösung der Bilder immer kleinere Strukturen sichtbar gemacht werden können. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass mit der Mikro-CT-Analyse keine Differenzierung organischer Bestandteile wie Knochenzellen, kollagene Fasern, Osteoid und Knochenmark möglich ist. Deswegen bleiben konventionelle histologische Verfahren unerlässlich, zum Beispiel um Osteoklasten auszuzählen.

Insgesamt betrachtet zeigen Serumanalyse, Histomorphometrie und Mikro-CT-Analyse einen katabolen Phänotyp der Fetuin-A Knock-out-Maus nach Partikelimplantation, der

Potential für weitere interessante Untersuchungen zur möglichen Prävention der Partikelkrankheit bietet.

#### 4.4 Verstärkte partikelinduzierte Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen

Die statistische Auswertung der Versuchsgruppen ergab signifikante Unterschiede für die Histomorphometrie. Die deskriptiven Mikro-CT Ergebnisse zeigten dieselbe Tendenz trotz fehlendem „interaction effect“ von Partikeln und Gruppe in der ANOVA-Testung. Die partikelinduzierte Osteolyse war bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ausgeprägter. Das entsprach allerdings nicht der Arbeitshypothese, dass durch die Hemmung von Fetuin-A eine partikelinduzierte Osteolyse reduziert bzw. verhindert werden kann. Multimethodisch konnte dies nicht nur an der Größe der erodierten Fläche mittels histologischer Schnitte, sondern auch mit den Messungen zum Verhältnis von BV/TV und von BV mit dem Mikro-CT gezeigt werden. Die Werte der Mikro-CT Untersuchung sind statistisch signifikant unterschiedlich, wobei die prozentualen Unterschiede gering sind. Inwieweit das Fehlen von Fetuin-A eine biologische Relevanz hat, ist aufgrund der alleinigen Mikro-CT Untersuchung nicht zu beantworten. Die 3D-Rekonstruktionen der Mäusecalvariae zeigen das unterschiedliche Osteolyseausmaß anschaulicher. Die verstärkte osteolytische Zerstörung an unterschiedlichen Stellen der Mäusecalvariae wird besonders deutlich bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit Partikelimplantation.

Es gibt verschiedene Ansätze, diese bislang unbekannte vermehrte partikelinduzierte Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen zu erklären. Denkbar sind Auswirkungen des Fetuin-A Knock-outs auf Entzündung, Calcifizierung, Apoptose und Knochenbildung. Diese vier möglichen Erklärungsansätze sollen im Folgenden genauer dargelegt werden.

1. Der Einfluss von Fetuin-A auf die lokale Entzündungsreaktion aufgrund von Operation und Partikelimplantation könnte zu einer vermehrten Osteolyse führen. Fetuin-A wirkt im Menschen als ein negatives Akut-Phase-Protein. Der Fetuin-A Spiegel im Blut sinkt bei schweren Infektionen sowie nach Traumata, Operationen und Verbrennungen signifikant (Garellick et al. 2010, Lebreton et al. 1979). Verschiedene Studien beschreiben Fetuin-A als ein anti-inflammatorisches Glycoprotein (Ombrellino et al. 2001, Wang et al. 2010). In-vitro-Versuche zeigten, dass hohe

Fetuin-A Konzentrationen, ähnlich denen in fötalem Blut, eine durch Lipopolysaccharide hervorgerufene Entzündungsreaktion verringern, indem sie die Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen, wie zum Beispiel TNF- $\alpha$ , reduzieren oder ganz unterbinden (Demetriou et al. 1996). Fetuin-A Konzentrationen, wie sie im Blut von Erwachsenen vorkommen, hatten dagegen keine große Auswirkung auf das Verhalten der Makrophagen (Dziegielewska et al. 1998). Für die vorliegende Studie könnte das bedeuten: Da den Fetuin-A Knock-out-Mäusen das antiinflammatorische Glycoprotein fehlt, entsteht eine ausgeprägte Entzündung, die, wie Kanaji et al. gezeigt haben, zu Osteolyse führen kann (Kanaji et al. 2009). Das könnte Ursache für die vermehrte Osteolyse sowohl bei den scheinoperierten Fetuin-A Knock-out-Mäusen als auch bei denen mit Partikelimplantation sein.

Im Gegensatz dazu stehen Zellkulturuntersuchungen von THP-1 Monozyten (Bylski et al. 2009, Hennige et al. 2008). Sowohl Fetuin-A als auch UHMWPE-Partikel führten in THP-1 Monozyten zu einer erhöhten Expression von TNF- $\alpha$  und damit zu vermehrter Entzündung. Für die vorliegende In-vivo-Studie würde das bedeuten, dass durch den Fetuin-A Knock-out die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  vermindert sein müsste. Daraus ergeben sich folgende Schlussfolgerungen: Die vermehrte Osteolyse in den Fetuin-A Knock-out-Mäusen lässt auf eine verstärkte Entzündungsreaktion schließen. Diese könnte dadurch erklärt werden, dass die Wirkung von Fetuin-A als negatives Akut-Phase-Protein größer ist als seine proinflammatorische Wirkung.

2. Ein weiterer Erklärungsansatz bezieht sich auf die Fähigkeit von Fetuin-A, Calciprotein-Partikel zu bilden (Schäfer et al. 2003). Das könnte die lokale partikelinduzierte Osteolyse beeinflussen. Denn Fetuin-A hemmt die Bildung von Calciumphosphat-Präzipitation, verlangsamt das Wachstum von Kristallkeimen und verhindert dadurch die ektope Calcifizierung. Im Umkehrschluss könnte der fehlende Einfluss von Fetuin-A auf die Calciumphosphat-Präzipitation zu vermehrter ektoper Calcifizierung im Bereich der Osteolyse führen - entsprechend der ektopen Calcifizierung bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen.

Die Operation führte in allen Gruppen zu erhöhten Calcium- und anorganischen Phosphatwerten. Das könnte darauf schließen lassen, dass die Bildung von Calciprotein-Partikeln in Fetuin-A Knock-out-Mäusen vermindert und eine ektope Calcifizierung nachweisbar sein würde. Die Mikro-CT-Analyse und die histologischen Schnitte zeigten aber keine ektope Calcifizierung im Bereich der Mäusecalvariae. Somit ist anzunehmen, dass die ektope Calcifizierung nicht, wie erwartet, lokal im

Bereich der Osteolysezone stattgefunden hat, sondern im umliegenden Weichteilgewebe. Eine solche Weichteilcalcifizierung ist, wie dargelegt, typisch für Fetuin-A Knock-out-Mäuse. Diese Annahme wird dadurch bekräftigt, dass bei der Mäusepräparation verhärtetes Weichteilgewebe aufgefallen ist. Eine ektope Calcifizierung könnte bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen zudem zu einem verminderten Knochenaufbau führen. Fetuin-A hält Calciumphosphat in Lösung, so dass diese potentiell schädliche Verbindung aus dem Blutkreislauf entfernt oder im Knochen abgelagert werden kann (Schäfer et al. 2003). Bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen ist das aber nicht möglich. Vielmehr könnte es sein, dass bei ihnen aufgrund der ektopen Calcifizierung nicht genügend Calcium und Phosphat zum Knochenaufbau zur Verfügung stehen. Das würde erklären, warum die Fetuin-A Knock-out-Mäuse mehr Osteolyse als die Wildtypmäuse haben: Sie können möglicherweise der durch die UHMWPE-Partikel hervorgerufenen Osteolyse weniger Knochenanbau entgegensetzen, da ihnen das Hydroxylapatit zum Knochenaufbau fehlt. Diese Überlegung wird durch die Laborwerte für AP und OPG gestützt. So wiesen die Fetuin-A Knock-out-Mäuse (Gruppe III und IV) im Vergleich zu den Wildtypmäusen (Gruppe I und II) signifikant niedrigere AP-Werte auf. Die alkalische Phosphatase wird von Osteoblasten zum Knochenaufbau benötigt. Sie spaltet unter anderem anorganisches Pyrophosphat auf, so dass genügend Phosphat für die Knochenbildung zur Verfügung steht (Schäfer et al. 2003). Gibt es zu wenig AP, kann nicht genügend Calciumphosphat in die Kollagenmatrix der Knochen eingelagert werden. Zudem wirkt das nicht gespaltene Pyrophosphat hemmend auf die Knochenmineralisierung (Schäfer et al. 2003).

Bei den OPG-Werten verhält es sich genau andersherum. Sie sind bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen höher als bei den Wildtypmäusen. OPG wirkt der RANK/RANKL-Verbindung entgegen und inhibiert die Osteolyse (Huo and Brown 2003). Die hohen OPG-Werte in der vorliegenden Studie könnten durch starke Verkalkungen im Weichteilgewebe der Fetuin-A Knock-out-Mäuse erklärt werden. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei vaskulärer Calcifizierung OPG erhöht ist (Messa et al. 2007, Shroff et al. 2008). In diesem Zusammenhang könnten die Serumparameter von Interesse sein. Im vorliegenden Versuch wurden sie ausschließlich vor der Operation und 14 Tage später, am Ende des Versuchs abgenommen. Aufschlussreich wäre eine Analyse der Parameter während der beiden postoperativen Wochen. So könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Entstehen der Osteolyse und damit einhergehenden Veränderungen der Serumparameter in Be-



zug auf den Knochenmetabolismus aufgedeckt werden. Das würde die Möglichkeit eröffnen, Serumparameter zu finden, mit denen eine aseptische Prothesenlockerung erkannt werden kann.

3. Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss von Fetuin-A auf die Phagozytose von apoptotischen Zellen, der bei der verstärkten Osteolyse von Fetuin-A Knock-out-Mäusen eine Rolle spielen könnte. Untersuchungen zeigten, dass bei partikelinduzierter Osteolyse vermehrt apoptotische Zellen ausgebildet werden (Landgraeber et al. 2006). Bei der Apoptose entstehen Apoptosekörper, membrangebundene Vesikel, die verschiedene Zellbestandteile enthalten. Sie spalten sich von der sterbenden Zelle ab und werden von Makrophagen aufgenommen (Radic et al. 2004, Schiller et al. 2008). Funktioniert die Phagozytose nur unzureichend, das heißt nicht alle apoptotischen Zellüberreste werden entfernt, induziert dies die Bildung proinflammatorischer Zytokine (Cerri et al. 2006, Heyder et al. 2007). Dadurch kommt es zur vermehrten Bildung von Osteoklasten und verstärkter Knochenresorption (Kido et al. 2004). Jesmann et al. haben gezeigt, dass Fetuin-A die Opsonierung von abgestorbenen Zellen und die Makropinozytose durch Makrophagen fördert (Jersmann et al. 2003). So können abgestorbene Zellen schneller entfernt werden. Bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen fehlt jedoch diese Unterstützung. Somit können die abgestorbenen Zellen länger am Ort der partikelinduzierten Osteolyse verweilen und die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen sowie - wie oben beschrieben - die Knochenresorption begünstigen.
4. Ein weiterer Erklärungsansatz beschäftigt sich mit der Beteiligung von Fetuin-A als Regulator an der Osteogenese (Binkert et al. 1999). Sein Einfluss auf das Knochenremodeling ist noch nicht abschließend geklärt. Harbowski et al. gingen dieser Frage 2004 nach und benutzten dazu ein Fraktur-Maus-Modell. Sie erzielten keine signifikanten Werte, stellten jedoch eine etwas bessere Bruchheilung bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen fest (Hrabowski et al. 2004). Szweras et al. zeigten 2002, dass die Knochenausbildung bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit zunehmendem Alter steigt, gemessen an der Kortikalisdicke, an dem beschleunigten Knochenremodeling der Knochentrabekel und der steigenden Anzahl von Osteoblasten an der Knochenoberfläche. Das Ergebnis der Studie war, dass Fetuin-A den TGF- $\beta$  abhängigen Signalweg der Osteoblasten hemmt. Darüber hinaus wurde dargelegt, dass Fetuin-A Knock-out-Mäuse Defekte in der Wachstumsfuge, steigende Knochenaus-

bildung und eine verstärkte Zytokin abhängige Osteogenese aufweisen (Szwera et al. 2002). Das lässt folgende Schlussfolgerung zu: Ist kein Fetuin-A vorhanden, wird TGF- $\beta$  als Rezeptor von Osteoblasten nicht mehr blockiert, und es kann mehr Knochen aufgebaut werden. Das hat sich in der vorliegenden Arbeit aber nicht bestätigt. Selbst die Fetuin-A Knock-out-Mäuse ohne Partikelimplantation zeigten mehr Osteolyse als die entsprechenden Wildtypmäuse.

Auffallend sind bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit Partikelimplantation die extrazellulär Trap-positiven Zellen. Ihre Zahl ist signifikant höher als bei den Wildtypmäusen mit Partikelimplantation. Dies könnte auf eine erhöhte osteoklastische Aktivität bei gleich bleibender Zahl von Osteoklasten hindeuten.

Offenbar hat das nicht Vorhandensein von Fetuin-A noch weitere Auswirkungen. Nahe liegend scheint ein Einfluss auf das OPG/RANKL/RANK-System. Die Blutwerte für RANKL und OPG/RANKL vor und nach der Operation konnten diese These aber nicht bestätigen. Auch die Auswertung der Osteoklastenzahl liefert keine Erklärung für das große Ausmaß der Osteolyse bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit Partikelimplantation. Sie zeigten zwar im Vergleich zu den Fetuin-A Knock-out-Mäusen ohne Partikelimplantation signifikant mehr Osteoklasten. Doch so verhielt es sich auch bei den Wildtypmäusen mit und ohne Partikelimplantation. Allerdings war der Unterschied bei den Wildtypmäusen nicht signifikant. Andere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die Implantation von Partikeln auch bei Wildtypmäusen zu einem signifikanten Osteoklastenanstieg führt (Neuerburg et al. 2012). Der Grund für das Ergebnis in der vorliegenden Studie lässt sich dadurch erklären, dass die Osteoklastenzahl bei den einzelnen Wildtypmäusen einer Gruppe stark variierte. Zu einem ähnlichen Ergebnis ist Szwera et al. in seiner Untersuchung 2002 gekommen (Szwera et al. 2002).

Betrachtet man die verschiedenen Erklärungsansätze als Teile eines komplexen Zusammenhangs, lässt sich daraus folgern: Das Zusammenspiel der bekannten Wirkungen von Fetuin-A mit einem Einfluss auf Entzündung, Calcifizierung, Apoptose und Knochenbildung führt zu einer vermehrten Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen. Um genau zu verstehen, welche Auswirkung Fetuin-A auf den Prozess der partikelinduzierten Osteolyse hat, sind weitere wissenschaftliche Untersuchungen notwendig. Hilfreich wären insbesondere weitere Arbeiten, welche die verschiedenen Wechselwirkungen von Fetuin-A mit den oben genannten Aspekten genauer betrachten.

## 4.5 Ausblick

In dieser Studie wurde das erste Mal ein möglicher Zusammenhang zwischen der partikelinduzierten Osteolyse und Fetuin-A untersucht. Die Ergebnisse im Mausmodell belegen, dass es einen Einfluss von Fetuin-A bzw. dessen Ausschaltung auf die partikelinduzierte Osteolyse gibt. Im Gegensatz zu der erwarteten Reduzierung der Osteolyse bei Fetuin-A Knock-out-Mäusen kam es jedoch zu einer erheblichen Vermehrung. Damit hat die vorliegende Arbeit eine Grundlage für weitere Untersuchungen über den Einfluss von Fetuin-A auf die partikelinduzierte Osteolyse geschaffen. Diese könnten den Ansatz verfolgen, durch eine Überexprimierung oder Substitution von Fetuin-A das Ausmaß der Osteolyse zu verringern. Das könnte wieder an einem Mausmodell untersucht werden, da es sich in dieser Arbeit erneut als geeignet erwiesen hat, um potentielle Einflussfaktoren auf die partikelinduzierte Osteolyse zu testen. An der Substitution von Fetuin-A wird derzeit an der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen geforscht.

Für eine kontinuierliche Substitution über zwei Wochen hinweg wäre eine große Menge Fetuin-A notwendig. Diese Menge könnte nur aus Kälber- oder menschlichem Serum gewonnen und zur Verfügung gestellt werden. Beide bergen das Risiko einer immunologischen Reaktion, die das Testergebnis verfälschen könnte. Schon geringe Mengen Endotoxin könnten zu einer vermehrten Osteolyse im Mausmodell führen. Deswegen scheint eine genetisch veränderte Maus mit einer Fetuin-A Überexpression geeigneter für weitere Studien.

## 5 Zusammenfassung

Das Hauptproblem der Implantation von Hüftendoprothesen sind Langzeitkomplikationen. Bei vielen Patienten kommt es nach einigen Jahren durch partikelinduzierte Osteolyse zu einer aseptischen Lockerung des Gelenkersatzes. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von Fetuin-A bzw. dessen Ausschaltung auf die partikelinduzierte Osteolyse untersucht.

Dazu wurde ein Osteolysemodell an murinen Calvariae von 10 Wildtypmäusen und 10 Fetuin-A Knock-out-Mäusen verwendet. Jeweils 5 Tiere der beiden Maustypen wurden scheinoperiert, den anderen 5 wurden Polyethylenpartikel auf die Schädelkalotte implantiert. Nach 14 Tagen wurde das Experiment beendet.

Das Ausmaß der Osteolyse wurde mit Hilfe von Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) und histologischen Schnitten gemessen und in dreidimensionalen Bildern (3D-Bildern) veranschaulicht. Die Zahl der Osteoklasten wurde anhand einer Tartratreisistent acid phosphatase (TRAP) - Färbung festgestellt. Zur biochemischen Analyse wurden vor und nach der Operation Blut- und Urinproben gewonnen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Analysis of variance (ANOVA)- und Statistical hypothesis test (T-Test).

Die tierexperimentelle Studie zeigte in der Histomorphometrie und Mikro-CT die ausgeprägtesten Osteolysen bei den Fetuin-A Knock-out-Mäusen mit Partikelimplantation. Die 3D-Bilder führten den unterschiedlichen Grad der Knochenresorption besonders deutlich vor Augen. Die Ergebnisse der Blut- und Urinproben korrelierten nicht mit dem Ausmaß der Osteolysen.

In dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Fetuin-A einen Einfluss auf die partikelinduzierte Osteolyse hat. Diese wird durch den Fetuin-A Knock-out verstärkt. Grund dafür ist offenbar ein komplexes Zusammenspiel der Wirkungen von Fetuin-A auf Entzündung, Calcifizierung, Apoptose und Knochenbildung. Damit bieten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gute Ansatzpunkte für weitere Studien über eine mögliche Prävention der partikelinduzierten Osteolyse durch Fetuin-A.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Affatato, S., Bersaglia, G., Rocchi, M., Taddei, P., Fagnano, C., Toni, A. (2005): Wear behaviour of cross-linked polyethylene assessed in vitro under severe conditions. *Biomaterials* 26(16), 3259-3267.
2. Atienza, C., Jr., Maloney, W.J. (2008): Highly cross-linked polyethylene bearing surfaces in total hip arthroplasty. *J Surg Orthop Adv* 17(1), 27-33.
3. Barmer, (2010): Report Krankenhaus 2010. Immer mehr neue Hüft- und Kniegelenke. Barmer Ersatzkasse. Online-Publikation; [www.barmer-gek.de](http://www.barmer-gek.de)
4. Baumann, B., Rader, C.P. (2007): Ätiologie und Pathogenese der periprothetischen Osteolyse. *Fortbildung Osteologie* 2, 57-65.
5. Baumann, B., Rader, C.P., Seufert, J., Noth, U., Rolf, O., Eulert, J., Jakob, F. (2004): Effects of polyethylene and TiAlV wear particles on expression of RANK, RANKL and OPG mRNA. *Acta Orthop Scand* 75(3), 295-302.
6. Benz, E.B., Federman, M., Godleski, J.J., Bierbaum, B.E., Thornhill, T.S., Spector, M. (2001): Transmission electron microscopy of intracellular particles of polyethylene from joint replacement prostheses: size distribution and cellular response. *Biomaterials* 22(21), 2835-2842.
7. Binkert, C., Demetriou, M., Sukhu, B., Szweras, M., Tenenbaum, H.C., Dennis, J.W. (1999): Regulation of osteogenesis by fetuin. *J Biol Chem* 274(40), 28514-28520.
8. Boehm, O., Zur, B., Koch, A., Tran, N., Freyenhagen, R., Hartmann, M., Zacharowski, K. (2007): Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem* 388(5), 547-554.
9. Bylski, D., Wedemeyer, C., Xu, J., Sterner, T., Loer, F., von Knoch, M. (2009): Alumina ceramic particles, in comparison with titanium particles, hardly affect the expression of RANK-, TNF-alpha-, and OPG-mRNA in the THP-1 human monocytic cell line. *J Biomed Mater Res A* 89(3), 707-716.
10. Callaghan, J.J., Salvati, E.A., Pellicci, P.M., Wilson, P.D., Ranawat, C.S. (1985): Results of revision for mechanical failure after cemented total hip replacement, 1979 to 1982. A two to five-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am* 67(7), 1074-1085.
11. Cerri, C., Chimenti, D., Conti, I., Neri, T., Paggiaro, P., Celi, A. (2006): Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator

- synthesis by human airway epithelial cells. *Journal of Immunology* 177(3), 1975-1980.
12. Charnley, J. (1961): Arthroplasty of the hip. A new operation. *Lancet* 1(7187), 1129-1132.
  13. Childs, L.M., Goater, J.J., O'Keefe, R.J., Schwarz, E.M. (2001): Efficacy of Etanercept for wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner Res* 16, 338-347.
  14. Chiu, R., Ma, T., Smith, R.L., Goodman, S.B. (2009): Ultrahigh molecular weight polyethylene wear debris inhibits osteoprogenitor proliferation and differentiation in vitro. *J Biomed Mater Res A* 89(1), 242-247.
  15. Claes, L., Kirschner, P., Perka, C., Rudert, M. (2012): *AE-Manual der Endoprothetik. Hüfte und Hüftrevision*. Heidelberg, Dordrecht (u.w.): Springer-Verlag.
  16. Cobb, J.P. (2009): Die entscheidenden Aspekte. *CeraNews* 1, 1-2.
  17. Coen, G., Ballanti, P., Silvestrini, G., Mantella, D., Manni, M., Di Giulio, S., Pisano, S., Leopizzi, M., Di Lullo, G., Bonucci, E. (2009): Immunohistochemical localization and mRNA expression of matrix Gla protein and fetuin-A in bone biopsies of hemodialysis patients. *Virchows Arch* 454(3), 263-271.
  18. Cramer, J., Ekkernkamp A., Ostermann P. (2001): Die infizierte Endoprothese am Beispiel der Hüftendoprothese. *ZaeFQ* 95, 195-201.
  19. David, V., Laroche, N., Boudignon, B., Lafage-Proust, M.H., Alexandre, C., Ruegsegger, P., Vico, L. (2003): Noninvasive in vivo monitoring of bone architecture alterations in hindlimb-unloaded female rats using novel three-dimensional microcomputed tomography. *J Bone Miner Res* 18(9), 1622-1631.
  20. Demetriou, M., Binkert, C., Sukhu, B., Tenenbaum, H.C., Dennis, J.W. (1996): Fetuin/alpha2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *The Journal of biological chemistry* 271(22), 12755-12761.
  21. Dickson, I.R., Poole, A.R., Veis, A. (1975): Localisation of plasma alpha2HS glycoprotein in mineralising human bone. *Nature* 256(5516), 430-432.
  22. Drees, P., Huber, L.C. (2004): Molekulare und zelluläre Mechanismen der aseptischen Prothesenlockerung. *Rheuma Nachrichten* 37, 12-26.
  23. Dreinhofer, K.E., Dieppe, P., Sturmer, T., Grober-Gratz, D., Floren, M., Gunther, K.P., Puhl, W., Brenner, H. (2006): Indications for total hip replacement: comparison of assessments of orthopaedic surgeons and referring physicians. *Ann Rheum Dis* 65(10), 1346-1350.

24. Düll, T.W. (2009): Langfristige Ergebnisse nach Revisionsoperationen in der Hüftendoprothetik. Dissertation Freiburg.
25. Dziegielewska, K.M., Andersen, N.A., Saunders, N.R. (1998): Modification of macrophage response to lipopolysaccharide by fetuin. *Immunology Letters* 60(1), 31-35.
26. Ebramzadeh, E., Campbell, P.A., Takamura, K.M., Lu, Z., Sangiorgio, S.N., Kalma, J.J., De Smet, K.A., Amstutz, H.C. (2011): Failure Modes of 433 Metal-on-Metal Hip Implants: How, Why, and Wear. *Orthop Clin North Am* 42(2), 241-250.
27. Elsner, D.-M.F. (2009): Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows. Universität Osnabrück, 102-108.
28. Endoprothesenregister Deutschland (2013). Online-Publikation; [www.eprd.de](http://www.eprd.de)
29. Eynon-Lewis, N.J., Ferry, D., Pearse, M.F. (1992): Themistocles Gluck: an unrecognised genius. *BMJ (Clinical research ed.)* 305(6868), 1534-1536.
30. Feldkamp, L.A., Goldstein, S.A., Parfitt, A.M., Jesion, G., Kleerekoper, M. (1989): The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 4(1), 3-11.
31. Garellick, G., Kärrholm, J., Rogmark, C., Herberts, P. (2010): Swedish Hip Arthroplasty Register. Online-Publikation; [www.shpr.se](http://www.shpr.se)
32. Gesellschaft für Versuchstierkunde (2009): Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT, 5.
33. Goodman, S.B., Huie, P., Song, Y., Schurman, D., Maloney, W., Woolson, S., Sibley, R. (1998): Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *J Bone Joint Surg Br* 80(3), 531-539.
34. Green, T.R., Fisher, J., Matthews, J.B., Stone, M.H., Ingham, E. (2000): Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. *J Biomed Mater Res* 53(5), 490-497.
35. Gressner, A.M., Arndt, T. (2013): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
36. Hanssen, A.D., Rand, J.A. (1988): A comparison of primary and revision total knee arthroplasty using the kinematic stabilizer prosthesis. *J Bone Joint Surg Am* 70(4), 491-499.
37. Hendrich, C. (2007): Aktives Alter. *CeraNews* 1, 4.

38. Hennige, A.M., Staiger, H., Wicke, C., Machicao, F., Fritsche, A., Haring, H.U., Stefan, N. (2008): Fetuin-A induces cytokine expression and suppresses adiponectin production. *PLoS One* 3(3), 1765.
39. Herrmann, M. (2012): Pathology of Ectopic Calcification in Fetuin-A Deficient Mice: Compensatory Gene Regulation and Mineralized Matrix Metabolism. Dissertation Aachen.
40. Heyder, P., Bekeredjian-Ding, I., Parcina, M., Blank, N., Ho, A.D., Herrmann, M., Lorenz, H.M., Heeg, K., Schiller, M. (2007): Purified apoptotic bodies stimulate plasmacytoid dendritic cells to produce IFN-alpha. *Autoimmunity* 40(4), 331-332.
41. Hillienhof, A. (2011): 400.000 Deutsche erhalten jährlich ein künstliches Gelenk. *Deutsches Ärzteblatt*, 2.
42. Hrabowski, M., Schäfer, C., Heute, S., Schwarz, M., Jahnen-Dechent, W., Voggenreiter, G. (2004): Frakturheilung in  $\alpha$ 2-HS Glycoprotein / Fetuin-A-defizienten Mäusen. Online-Publikation; [www.egms.de](http://www.egms.de)
43. Huo, M.H., Brown, B.S. (2003): What's new in hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 85-A(9), 1852-1864.
44. Ingham, E., Fisher, J. (2000): Biological reactions to wear debris in total joint replacement. *Proc Inst Mech Eng H* 214(1), 21-37.
45. Jaeckel, S. (2010): Hemmung Polyethylenpartikel induzierter Osteolysen durch Pan-Caspase-Inhibition – Untersuchungen im partikelassoziierten murinen Osteolysemodell. Dissertation Duisburg-Essen
46. Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schäfer, C., Ketteler, M. (2011): Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res* 108(12), 1494-1509.
47. Jahnen-Dechent, W., Schinke, T., Trindl, A., Muller-Esterl, W., Sablitzky, F., Kaiser, S., Blessing, M. (1997): Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *The Journal of biological chemistry* 272(50), 31496-31503.
48. Jersmann, H.P., Dransfield, I., Hart, S.P. (2003): Fetuin/ $\alpha$ 2-HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages. *Clin Sci (Lond)* 105(3), 273-278.
49. Kanaji, A., Caicedo, M.S., Viridi, A.S., Sumner, D.R., Hallab, N.J., Sena, K. (2009): Co-Cr-Mo alloy particles induce tumor necrosis factor alpha production in MLO-Y4 osteocytes: a role for osteocytes in particle-induced inflammation. *Bone* 45(3), 528-533.



50. Kauther, M.D., Zimmermann, C., Bachmann, H., Broecker-Preuss, M., Hilken, G., von Knoch, M., Wedemeyer, C. (2010): Biochemical markers of particle induced osteolysis in C57BL/6 mice. *Clin Chem Lab Med* 48(11), 1641-1646.
51. Ketteler, M., Bongartz, P., Westendorf, R., Wildberger, J.E., Mahnen, A.H., Böhm, R., Metzger, T., Wanner, C., Jähnen-Dechent, W., Floege, J. (2003): Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 361(9360), 827-833.
52. Kido, A., Pap, G., Nagler, D.K., Ziomek, E., Menard, R., Neumann, H.W., Roessner, A. (2004): Protease expression in interface tissues around loose arthroplasties. *Clinical orthopaedics and related research* (425), 230-236.
53. Krenn, V. (2013): Pathologie und histopathologische Diagnostik nach Implantation von Endoprothesen. In: Krukemeyer, M.G., Möllenhoff, G. (Hrsg.): *Endoprothetik: Leitfäden für Praktiker*. S.47-56. Berlin/Boston: Walter de Gruyter.
54. Landgraeber, S., Jaekel, S., Loer, F., Wedemeyer, C., Hilken, G., Canbay, A., Totsch, M., von Knoch, M. (2009): Pan-caspase inhibition suppresses polyethylene particle-induced osteolysis. *Apoptosis* 14(2), 173-181.
55. Landgraeber, S., Putz, S., Schlattjan, M., Bechmann, L.P., Totsch, M., Grabellus, F., Hilken, G., Jäger, M., Canbay, A. (2014): Adiponectin attenuates osteolysis in aseptic loosening of total hip replacements. *Acta Biomater* 10(1), 384-393.
56. Landgraeber, S., Toetsch, M., Wedemeyer, C., Saxler, G., Tsokos, M., von Knoch, F., Neuhauser, M., Loer, F., von Knoch, M. (2006): Over-expression of p53/BAK in aseptic loosening after total hip replacement. *Biomaterials* 27(15), 3010-3020.
57. Landgraeber, S., Wegner, A., Canbay, A., von Knoch, M. (2010): Serum levels of adiponectin in patients with aseptic loosening after total hip replacement. *J Biomed Mater Res A* 93(2), 748-752.
58. Lebreton, J.P., Joisel, F., Raoult, J.P., Lannuzel, B., Rogez, J.P., Humbert, G. (1979): Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *The Journal of clinical investigation* 64(4), 1118-1129.
59. Lettner, A.E. (2001): Die Bestimmung des Desoxypyridinolin/Kreatinin-Quotienten bei Seniorenheimbewohnern als Screening-Untersuchung auf einen gesteigerten Knochenabbau. Dissertation München.
60. Levin, J., Bang, F.B. (1964): A Description of Cellular Coagulation in the Limulus. *Bull Johns Hopkins Hosp* 115, 337-345.

61. Li, Y., Zhang, C., Zhou, X., Wang, H., Mao, Y., Wang, X. (2014): Parthenolide inhibits polyethylene particle-induced mouse calvarial osteolysis in vivo. *J Surg Res* 187(1), 176-181.
62. Löffler, G., Petrides, P.E., Heinrich, P.C. (2007): *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Aufl., London: Springer Verlag.
63. Ludwig-Mayerhofer, W. (2010): *Varianzanalyse (engl.: Analysis of Variance)*. Online-Publikation; [www.wlm.userweb.mwn.de](http://www.wlm.userweb.mwn.de)
64. Mabrey, J.D., Afsar-Keshmiri, A., Engh, G.A., Sychterz, C.J., Wirth, M.A., Rockwood, C.A., Agrawal, C.M. (2002): Standardized analysis of UHMWPE wear particles from failed total joint arthroplasties. *J Biomed Mater Res* 63(5), 475-483.
65. Maloney, W.J., Galante, J.O., Anderson, M., Goldberg, V., Harris, W.H., Jacobs, J., Kraay, M., Lachiewicz, P., Rubash, H.E., Schutzer, S., Woolson, S.T. (1999): Fixation, polyethylene wear, and pelvic osteolysis in primary total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res* 369(369), 157-164.
66. Martell, J. (2007): Genaue Messung. In-vivo Abriebraten in der Hüftendoprothetik. *CeraNews* 1, 1-2..
67. Messa, P., Alberti, L., Como, G., Cerutti, R., Mandujano, B., Tirelli, S., Torresani, E., Brezzi, B. (2007): Calcimimetic increases osteoprotegerin and decreases fetuin-A levels in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 22(9), 2724-2725.
68. Michael, J.W.-P., Schlüter-Brust, K.U., Eysel, P. (2010): Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik und Therapie der Gonarthrose. *Deutsches Ärzteblatt*, 107(9), 152-162.
69. Neuerburg, C., Impellizzeri, F., Goldhahn, J., Frey, P., Naal, F.D., von Knoch, M., Leunig, M., von Knoch, F. (2012): Survivorship of second-generation metal-on-metal primary total hip replacement. *Arch Orthop Trauma Surg* 132(4), 527-533.
70. Nouri, H., Kallel, S., Slimane, M.H., Meherzi, M.H., Ouertatani, M., Karay, S. (2008): Revision total hip arthroplasty with cemented femoral component. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* 18(5), 327-332.
71. Ombrellino, M., Wang, H., Yang, H., Zhang, M., Vishnubhakat, J., Frazier, A., Scher, L.A., Friedman, S.G., Tracey, K.J. (2001): Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock (Augusta,Ga.)* 15(3), 181-185.
72. Otto, M. (2008): Klassifikation bei Protheseninsuffizienz und Partikelbestimmung. *Pathologie* 29(1), 232-239.
73. Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R. (1987): Bone histomorphometry: standardization of

- nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2(6), 595-610.
74. Patil, N., Jin, W.-T., Mow, C.S. (2008): Polyethylene Wear Particle Induced Osteolysis in Total Hip Replacement. *Malaysian Orthopaedic Journal* 2(1), 1-7.
75. Purdue, P.E., Koulouvaris, P., Nestor, B.J., Sculco, T.P. (2006): The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis. *HSS J* 2(2), 102-113.
76. Radic, M., Marion, T., Monestier, M. (2004): Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *Journal of Immunology*, 172(11), 6692-6700.
77. Rao, A.J., Zwingenberger, S., Valladares, R., Li, C., Lane Smith, R., Goodman, S.B., Nich, C. (2013): Direct subcutaneous injection of polyethylene particles over the murine calvaria results in dramatic osteolysis. *Int Orthop* 37(7), 1393-1398.
78. Schäfer, C. (2003): Biochemische und funktionelle Charakterisierung einer gerichteten Gendelektion (Knockout) von Fetuin-A in Mäusen. Dissertation Aachen.
79. Schäfer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., Muller-Esterl, W., Schinke, T., Jahnke-Dechent, W. (2003): The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 112(3), 357-366.
80. Schiller, M., Bekeredjian-Ding, I., Heyder, P., Blank, N., Ho, A.D., Lorenz, H.M. (2008): Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell death and differentiation* 15(1), 183-191.
81. Schmidt-Gayk, H., Reichel, H., Roth, H.J., von Gaudecker, C., Müller, C.. (2004): Labordiagnostik bei renaler Osteopathie. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Osteologie* (13), 151-163.
82. Schwarz, E.M., Benz, E.B., Lu, A.P., Goater, J.J., Mollano, A.V., Rosier, R.N., Puzas, J.E., Okeefe, R.J. (2000): Quantitative small-animal surrogate to evaluate drug efficacy in preventing wear debris-induced osteolysis. *J Orthop Res* 18(6), 849-855.
83. Shroff, R.C., Shah, V., Hiorns, M.P., Schoppet, M., Hofbauer, L.C., Hawa, G., Schurgers, L.J., Singhal, A., Merryweather, I., Brogan, P., Shanahan, C., Deanfield, J., Rees, L. (2008): The circulating calcification inhibitors, fetuin-A and osteoprotegerin, but not matrix Gla protein, are associated with vascular stiffness and calcification in children on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 23(10), 3263-3271.
84. Siebenand, S. (2009): Antikörper stoppt Knochenverlust. *Pharmazeutische Zeitung*, 12. Online-Publikation; [www.pharmazeutische-zeitung.de](http://www.pharmazeutische-zeitung.de)

85. Silva, M.J., Sandell, L.J. (2002): What's new in orthopaedic research. *J Bone Joint Surg Am* 84-A(8), 1490-1496.
86. Statistisches Bundesamt Deutschland. (2012): Die 50 häufigsten Operationen der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern (Rang, Anzahl, Anteil in Prozent). Gliederungsmerkmale: Jahre, Deutschland, Geschlecht, Art der Operation. Online-Publikation; [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de)
87. Swaminathan, R. (2001): Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 313(1-2), 95-105.
88. Szweras, M., Liu, D., Partridge, E.A., Pawling, J., Sukhu, B., Clokie, C., Jahnen-Dechent, W., Tenenbaum, H.C., Swallow, C.J., Grynopas, M.D., Dennis, J.W. (2002): Alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling. *J Biol Chem* 277(22), 19991-19997.
89. The Jackson Laboratory (2014): Strain Name: C57BL/6J. Online-Publikation; <http://jaxmice.jax.org>
90. Triffitt, J.T., Gebauer, U., Owen, M.E. (1976): Synthesis by the liver of a glycoprotein which is concentrated in bone matrix. *Calcified tissue research* 21 Suppl, 437-441.
91. von Foerster, G., Buchholz, H.W., Lodenkamper, H., Lodenkamper, U. (1987): Antibiotics and bone cements-local therapeutic significance. *Aktuelle Probleme in Chirurgie und Orthopädie* 31, 227-233.
92. von Knoch, M., Sprecher, C., Barden, B., Saxler, G., Loer, F., Wimmer, M. (2004): Size and shape of commercially available polyethylene particles for in-vitro and in-vivo-experiments. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 142(3), 366-370.
93. Wang, L., Shi, X., Zhao, R., Halloran, B.H., Clark, D.J., Jacobs, C.R., Kingery, W.S. (2010): Calcitonin-gene-related peptide stimulates stromal cell osteogenic differentiation and inhibits RANKL induced NF-kappaB activation, osteoclastogenesis and bone resorption. *Bone* 46(5), 1369-1379.
94. Warwas, S., Haversath, M., Marx, A., Quitmann, H., Jäger, M., Landgraeber, S. (2013): Serum-Desoxypyridinolin zur Diagnostik der aseptischen Prothesenlockerung. Online-Publikation; [www.egms.de](http://www.egms.de)
95. Wedemeyer, C. (2005): Prävention und Behandlung partikelbedingter Osteolysen durch Zoledronat Zometa. Dissertation Duisburg-Essen.
96. Wedemeyer, C., Neuerburg, C., Pfeiffer, A., Heckeley, A., Bylski, D., von Knoch, F., Schinke, T., Hilken, G., Gosheger, G., von Knoch, M., Loer, F., Saxler, G. (2007):

- Polyethylene particle-induced bone resorption in alpha-calcitonin gene-related peptide-deficient mice. *J Bone Miner Res* 22(7), 1011-1019.
97. Wedemeyer, C., Neuerburg, C., Pfeiffer, A., Heckelei, A., von Knoch, F., Hilken, G., Brankamp, J., Henschke, F., von Knoch, M., Loer, F., Saxler, G. (2007): Polyethylene particle-induced bone resorption in substance P-deficient mice. *Calcif Tissue Int* 80(4), 268-274.
98. Wedemeyer, C., Xu, J., Neuerburg, C., Landgraeber, S., Malyar, N.M., von Knoch, F., Gosheger, G., von Knoch, M., Loer, F., Saxler, G. (2007): Particle-induced osteolysis in three-dimensional micro-computed tomography. *Calcif Tissue Int* 81(5), 394-402.

## 7 Anhang

### 7.1 Mikro-CT Bilder

1. Während der Mikro-CT Untersuchung wurden verschiedene Bilder angefertigt. Hier 2 Übersichtsbilder, aufgenommen aus verschiedenen Winkeln.

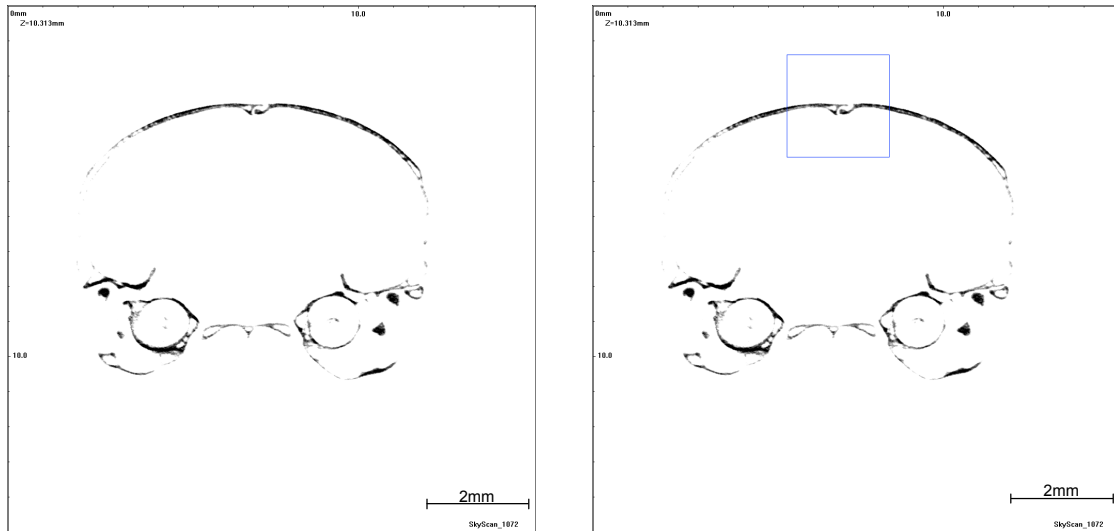


Abbildung 1: Mikro-CT Übersichtsbild, 19,23-fache Vergrößerung, links kranial. Die Gesamttrotation betrug  $180^\circ$  und der Rotationswinkel  $0.9^\circ$ . Insgesamt entstanden 200 Aufnahmen pro Schädel.



Abbildung 2: Mikro-CT Übersichtsbild, 19,23-fache Vergrößerung, rechts lateral. Die Gesamttrotation betrug  $180^\circ$  und der Rotationswinkel  $0.9^\circ$ . Insgesamt entstanden 200 Aufnahmen pro Schädel.

2. Zur Rekonstruktion wurden von einem festgelegten Abschnitt des Mausschädels Querschnitte erstellt.



Abbildungen 3+4: Beispiel für ein Querschnittsbild (700) eines Mausschädels, links ohne ROI-Rahmen, rechts mit ROI-Rahmen. Für den Filter wurde ein minimaler und ein maximaler Wert von 0,308 und 0,522 gewählt, um den Knochen darzustellen.

3. Die ROI wurde zentral über die Mittelliniensutur gelegt und umfasste eine Fläche von 2x2 mm<sup>2</sup>.



Abbildung 5+6: Beispielbilder für eine ROI, links der Gruppe III (Querschnitt 600), rechts der Gruppe IV (Querschnitt 600) mit einer Fläche von 2x2 mm<sup>2</sup>.

4. Das VOI wurde zentral über die Mittelliniensutur gelegt.

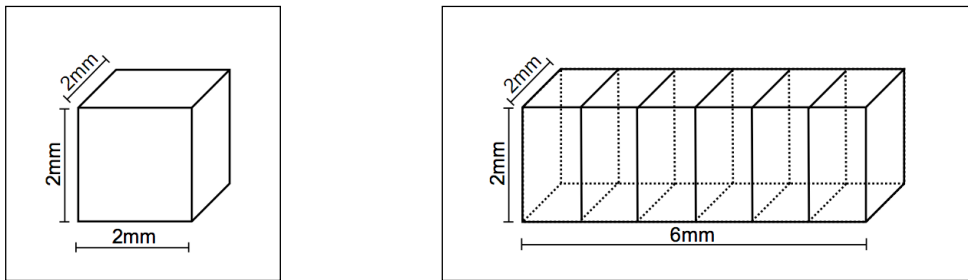


Abbildung 7+8: Beispiel VOI, rechts ein Cube, links die gesamte Größe des VOIs. Ein Cube umfasst ein Volumen von  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ . Insgesamt erstreckt sich das VOI im Bereich der Mittelliniensutur über eine Länge von 6 mm bestehend aus 5 Cubes.

#### 5. Mikro-Computertomograph



Abbildung 9: X-Ray Microtomograph vom Typ Skyscan 1072 mit einer Ortsauflösung zwischen 5 und 50  $\mu\text{m}$ .

### 7.2 Limulus Amoebozyten Assay

Alle Verdünnungen wurden mit endotoxinfreiem Aqua dest. durchgeführt. Es wurde nur mit pyrogenfreien Pipettenspitzen, Pipetten und Röhrchen gearbeitet (Endosafe Limited Charles River, Endosafe Tubes (13x100 mm) Depyrogenated Tubes Tested to < 0,001 EU/ml, Kent/England).

Der Standard wurde auf Raumtemperatur gebracht, mit dem Vortexer gerührt und in die endotoxinfreien Röhrchen überführt.

Aus diesem Standard wurde eine Verdünnung hergestellt, die einer Konzentration von 10 EU/ml entsprach.

Hier: 0,5ml aus Standard mit 3,5ml  $\text{H}_2\text{O}$  = 10 EU/ml (1:8)

Aus dieser Verdünnung wurde wiederum eine 1:10 Verdünnung hergestellt, so dass die Gebrauchsverdünnung eine Konzentration von 1EU/ml enthielt.



Hier: 250µl aus Standard I mit 2,5ml H<sub>2</sub>O = 1 EU/ml (1:10)

In einem zweiten Arbeitsschritt wurden die LAL-Röhrchen gefüllt:

- (1) Negativkontrolle = ein Röhrchen mit 200µl dest.
- (2) Positivkontrolle = ein Röhrchen 100µl dest.+ 100µl 1. Standardverdünnung
- (3) Proben
  - 1. Röhrchen : 200µl Probe
  - 2. Röhrchen : 100µl + 100µl 1. Standardarbeitsverdünnung  
(diente als Produktkontrolle, Nachweis eventuell vorhandener Hemmstoffe)
- (4) Inkubation im 37° C warmen H<sub>2</sub>O-Bad

PEP Probe	Negativkontrolle	Positivkontrolle
Negativ (-) [flüssig]	Negativ (-) [flüssig]	Positiv (+) [geliert]

## 7.3 Herstellung der histologischen Schnitte

### 7.3.1 Entkalkung

Die Präparate wurden in einem Zeitraum von 12 Stunden bei 37°C in einer neutralen EDTA Lösung in einem Ultraschall-Entkalkungsbad (Medite USE 33, MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland) entkalkt.

- 250g Titriplex III (Merck, Nr. 8421, Darmstadt, Deutschland) + 800ml Aqua dest. verrühren und erwärmen
- 50ml 40%-ige Natronlauge zugeben und auf der Kochplatte unter Rühren erwärmen, bis eine klare Lösung entsteht
- mit Aqua dest. auf 980ml bringen
- pH-Wert auf 7,4 einstellen

### 7.3.2 Entwässerung

Nach der Entkalkung wurden die Präparate über Nacht in einem vollständig geschlossenen Gewebereinbettautomaten (Shandon Pathcentre, Thermo Electron Corporation, Basingstoke, England) entwässert und paraffiniert. Das System arbeitet mit den Einbettungsparametern Wärme, Vakuum, Druck und Agitation. Zunächst erfolgte eine Refixa-

tion mit 4%-ig gepuffertem Formalin. Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 2 x 96%, 2 x 99%) entwässert. Die abschließende Entwässerung und Einparaffinierung erfolgte mit Xylol und Paraffin.

### **7.3.3 Ausguss in Paraffin**

Danach wurden die Präparate in Paraffin ausgegossen. Hierzu wurde der Boden einer Ausgussform mit flüssigem Paraffin bedeckt und auf einer Kühlplatte kurz abgekühlt. Die Präparate wurden in einer Kapsel in die Ausgussform gelegt und mit flüssigem Paraffin bedeckt. Nach dem Aushärten und dem Entfernen der Ausgussform entstand so ein Paraffinblock.

### **7.3.4 Schneiden der Präparate und Aufbringen auf den Objektträger**

Mit einem Schlitten-Mikrotom wurden von dem Block 4µm dicke Schnitte angefertigt und in einem Wasserbad gestreckt. Dann kamen sie auf einen Objektträger.

## **7.4 Färbung der Präparate**

### **7.4.1 HE-Färbung**

Für die HE-Färbung wurden die Präparate zunächst 15 Minuten bei ca. 80°C im Wärmeschrank gelagert, um das Paraffin abzuschmelzen. Anschließend erfolgte die HE-Färbung .

- 5 min. Färben in Hämalaun-Lösung (Hämalaun 2g; Kaliumaluminiumsulfat 100g; Kaliumjodat 0,4g; Aqua dest. 2000ml)
- 5 min. unter fließendem Wasser
- 1,5 min. Färben in Erythrosin B-Lösung 0.1% wässrig
- Spülen mit Aqua dest.
- Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 2x96%, 2x100%)
- 2x2 min. Xylol
- Eindecken mit Pertex

#### 7.4.2 TRAP-Färbung

Entparaffinierte Schnitte bis 96% Alkohol

- 10 min. TRAP-Puffer (Na-Acetat 3,28g; Na-Tartrat 46,01; Aqua dest. 1000ml; mit Eisessig auf pH 5.0 eingestellt)
- 90 min. TRAP-Färbelösung bei 37° (Naphtol AS-Mix Phosphat 20mg; N-Dimethylformamid 2ml; Fast Red Violet LB Salt 120mg; Triton X-100 1ml; TRAP-Puffer 100ml)
- Aqua dest. Spülen
- 1 min. Hämaun nach Meyer (Hämaun 2g; Aluminiumkaliumsulfat 100g; Kaliumjodat 0,4g; Aqua dest. 1000ml)
- Unter Leitungswasser bläuen
- Alkohol 70%
- Alkohol 96%
- Alkohol 100%
- Xylol
- Eindecken mit Pertex

## 7.5 Tabellen

**Tabelle 1: Gruppenverteilung**

Gruppe	Anzahl der Tiere	Operation	Partikel
I	5	Ja	Nein
II	5	Ja	Ja
III	5	Ja	Nein
IV	5	Ja	Ja

Die Tabelle zeigt die Gruppenaufteilung der insgesamt zwanzig Mäuse.

**Tabelle 2a: Laborwerte**

Parameter	RANKL pg/ml		OPG pg/ml		Osteocalcin ng/ml		OPG/RANKL pg/ml	
Tag der Entnahme	0	14	0	14	0	14	0	14
<b>Gruppe I</b>								
Mittelwert	99,77	138,04	1757,82	1631,76	116,09	63,07	18,02	12,04
SD	17,64	16,63	146,62	169,92	11,97	15,83	2,63	2,15
<b>Gruppe II</b>								
Mittelwert	91,07	130,04	1612,79	1654,21	115,65	105,73	20,30	13,16
SD	31,74	14,78	297,45	178,06	10,97	24,23	8,52	1,81
<b>Gruppe III</b>								
Mittelwert	103,33	94,51	2074,09	1884,05	63,36	71,48	22,15	20,08
SD	31,54	7,07	94,58	245,76	21,12	26,36	6,93	3,32
<b>Gruppe IV</b>								
Mittelwert	88,76	122,16	1998,46	2425,80	102,19	103,95	25,61	19,93
SD	25,08	2,58	12,90	357,95	9,35	42,09	7,29	3,34

Die Tabelle 2a zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Laborwerte von den Mäusegruppen I – IV prä- und postoperativ.

**Tabelle 2b: Laborwerte**

Parameter	DPD/Kreatinin nmol/mmol		Phosphat mg/dl		Calcium mmol/l		AP U/l	
Tag der Entnahme	0	14	0	14	0	14	0	14
<b>Gruppe I</b>								
Mittelwert	14,53	18,96	5,41	12,48	2,27	2,87	353,58	253,30
SD	1,26	1,99	0,66	1,18	0,12	0,16	20,55	52,71
<b>Gruppe II</b>								
Mittelwert	16,41	23,82	5,03	12,05	2,25	3,02	327,22	263,46
SD	3,18	3,10	0,73	1,47	0,10	0,39	19,81	64,45
<b>Gruppe III</b>								
Mittelwert	12,37	15,86	4,80	12,42	1,74	2,86	190,50	94,60
SD	0,85	1,02	0,64	3,03	0,14	0,30	28,48	9,29
<b>Gruppe IV</b>								
Mittelwert	15,22	16,72	5,26	12,24	1,69	2,98	182,30	101,53
SD	1,84	3,14	0,24	0,86	0,18	0,05	27,75	41,48

Die Tabelle 2b zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Laborwerte von den Mäusegruppen I – IV prä- und postoperativ.

**Tabelle 3: Mittelliniensuturfläche in mm<sup>2</sup>**

	Gruppe I	Mittellinien-suturfläche in mm <sup>2</sup>	Gruppe II	Mittellinien-suturfläche in mm <sup>2</sup>	Gruppe III	Mittellinien-suturfläche in mm <sup>2</sup>	Gruppe IV	Mittellinien-suturfläche in mm <sup>2</sup>
	1.1	0,1	2.1	0,11	3.1	0,23	4.1	0,32
	1.2	0,04	2.2	0,07	3.2	0,08	4.2	0,33
	1.3	0,06	2.3	0,16	3.3	0,15	4.3	0,32
	1.4	0,05	2.4	0,12	3.4	0,01	4.4	0,32
	1.5	0,04	2.5	0,22	3.5	0,1	4.5	0,29
Mittelwert		0,06		0,14		0,11		0,32
SD		0,02		0,06		0,08		0,14
Min.		0,04		0,07		0,01		0,29
Max.		0,1		0,22		0,23		0,33

Es sind für die Gruppen I-IV die gemessenen Mittelliniensuturflächen als Mittelwerte für jede einzelne Maus und die jeweilige Gruppe aufgeführt. Zusätzlich sind die Standardabweichung und jeweils der minimale und maximale Wert pro Mausgruppe angegeben.

**Tabelle 4: Osteoklastenanzahl**

	Gruppe I	Osteoklastenanzahl	Gruppe II	Osteoklastenanzahl	Gruppe III	Osteoklastenanzahl	Gruppe IV	Osteoklastenanzahl
	1.1	2,25	2.1	9	3.1	6,25	4.1	14,5
	1.2	17	2.2	16,7	3.2	5,5	4.2	18,8
	1.3	9,7	2.3	19	3.3	7,7	4.3	17,7
	1.4	10,7	2.4	27	3.4	4,5	4.4	10,3
	1.5	8,7	2.5	6	3.5	8	4.5	6
Mittelwert		9,67		15,54		6,39		13,46
SD		5,26		8,34		1,47		5,32
Min.		2,25		6		4,5		6
Max.		10,7		27		8		18,8

Es sind für die Gruppen I-IV die gezählten Osteoklasten als Mittelwerte für jede einzelne Maus und die jeweilige Gruppe aufgeführt. Zusätzlich sind die Standardabweichung und jeweils der minimale und maximale Wert pro Mausgruppe angegeben.

**Tabelle 5: Knochenvolumen (BV) in mm<sup>3</sup>**

	Gruppe I	BV in mm <sup>3</sup>	Gruppe II	BV in mm <sup>3</sup>	Gruppe III	BV in mm <sup>3</sup>	Gruppe IV	BV in mm <sup>3</sup>
	1.1	0,602	2.1	0,503	3.1	0,499	4.1	0,528
	1.2	0,554	2.2	0,508	3.2	0,504	4.2	0,501
	1.3	0,518	2.3	0,563	3.3	0,518	4.3	0,496
	1.4	0,494	2.4	0,545	3.4	0,529	4.4	0,497
	1.5	0,550	2.5	0,498	3.5	0,578	4.5	0,503
Mittelwert		0,54		0,52		0,53		0,5
SD		0,02		0,01		0,01		0,01
Min.		0,494		0,498		0,499		0,496
Max.		0,602		0,563		0,578		0,528

Es sind für die Gruppen I-IV die mit dem Mikro-CT gemessenen Mittelwerte des BV für jede einzelne Maus und die jeweilige Gruppe aufgeführt. Zusätzlich sind die Standardabweichung und jeweils der minimale und maximale Wert pro Mausgruppe angegeben.

**Tabelle 6: Relatives Knochenvolumen (BV/TV) in %**

	Gruppe I	BV/TV in %	Gruppe II	BV/TV in %	Gruppe III	BV/TV in %	Gruppe IV	BV/TV in %
	1.1	6,808	2.1	5,859	3.1	5,698	4.1	5,970
	1.2	6,457	2.2	5,911	3.2	5,920	4.2	5,672
	1.3	5,998	2.3	6,372	3.3	5,963	4.3	5,610
	1.4	5,595	2.4	6,221	3.4	5,988	4.4	5,620
	1.5	6,405	2.5	5,633	3.5	6,540	4.5	5,696
Mittelwert		6,25		5,99		6,03		5,71
SD		0,17		0,09		0,03		0,09
Min.		5,595		5,633		5,698		5,610
Max.		6,808		6,372		6,540		5,970

Es sind für die Gruppen I-IV die mit dem Mikro-CT gemessenen Mittelwerte des BV/TV für jede einzelne Maus und die jeweilige Gruppe aufgeführt. Zusätzlich sind die Standardabweichung und jeweils der minimale und maximale Wert pro Mausgruppe angegeben.

## 7.6 Abkürzungsverzeichnis

Ahsg	$\alpha$ 2-Heremans-Schmid Glycoprotein
Ahsg-/-	Fetuin-A Knock-out-Mäuse
Ahsg+/+	Wildtypmäuse
ANOVA	Analysis of variance
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone morphogenetic protein
BV	Bonevolume
C57BL/J6	C57 black 6 – laboratory mice
CCD-Detektor	Charge-Coupled-Device-Detektor
CT	Computertomographie
D1-D3	Domäne 1 – Domäne 3
DBA/2	Dilute brown non-agouti/2
DPD	Desoxypyridinolin-crosslinks
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IL 1	Interleukin 1
IL 6	Interleukin 6
LAL	Limulus Amoebocyten Lysat
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
Mikro-CT	Mikrocomputertomographie
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
OPG	Osteoprotegerin
PGE2	Prostaglandin E2
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
ROI	Region of Interest
SD	Standardabweichung
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta
THP-1	Human acute monocytic leukemia cell line
TIF	Tagged image file format
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TRANCE	Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine
TRAP	Tartrat-resistent acid phosphatase



T-Test	Statistical hypothesis test
TV	Tissuevolume
UHMWPE	Ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen
VOI	Volume of Interest

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Priv.-Doz. Dr. med. Christian Wedemeyer. Er hat mich umfassend, zügig und engagiert unterstützt. Ebenso Dr. Max Daniel Kauther, der meine Arbeit mit großem Einsatz betreut hat. Er hat mir nicht nur bei allen Fragen weiter geholfen, sondern mich auch bei der statistischen Auswertung maßgeblich unterstützt.

Herzlich danken möchte ich auch Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Jahnen-Dechent von der RWTH Aachen. Er hat nicht nur die Fetuin-A Knock-out-Mäuse für das Forschungsprojekt zur Verfügung gestellt, sondern stand als Experte bei allen Fragen rund um Fetuin-A immer zur Verfügung.

Danken möchte ich Prof. Dr. rer. nat. Gero Hilken vom Zentralen Tierlabor der Uniklinik Essen. Unter seiner Anleitung habe ich das Arbeiten und den Umgang mit Versuchstieren gelernt. Außerdem hat er mir bei der Operation der Mäuse geholfen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Bodo Levkau von der Pathophysiologie der Uniklinik Essen, der mir das Mikro-CT zur Verfügung gestellt hat, sowie bei Priv.-Doz. Dr. med. Martin Tötsch vom Institut für Pathologie der Uniklinik Essen für die Überlassung eines Mikroskop-Arbeitsplatzes und seine fachliche Unterstützung. Dank auch an sein Team für die histologische Aufbereitung der Präparate.

Zum Gelingen meiner Doktorarbeit haben noch viele weitere Personen beigetragen, denen ich danken möchte. Es sind zu viele, um sie hier alle namentlich zu nennen.

## **9 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.